

Aus der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Komm. Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Die Assoziation von ABCB1 Genpolymorphismen mit
der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Antiepileptika
bei Kindern**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Celina v. Stülpnagel-Frfr. v. Oefe
aus Darmstadt
2008

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Rudolf Gruber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Soheyl Noachtar

Prof. Dr. Gerd Schulte-Körne

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. H. Plischke

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2008

Gewidmet meiner Tochter Chiara Louisa

I. Verzeichnisse

I.	Verzeichnisse	4
1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Abbildungsverzeichnis	10
II.	Einleitung	12
III.	Allgemeiner Teil	14
1.	Epilepsie	14
1.1.	Definitionen	14
1.2.	Vorkommen und Häufigkeit	15
1.3.	Ätiologie	15
1.4.	Pathogenese	15
1.5.	Klinik	17
1.6.	Diagnose	19
1.7.	Differentialdiagnose	21
1.8.	Verlauf und Prognose	21
2.	Therapie	22
2.1.	Allgemeiner Überblick	22
2.2.	Antiepileptika	25
3.	Pharmakogenomik/ -genetik	27
3.1.	Definition	27
4.	Pharmakoresistenz	27
4.1.	Definition	27
4.2.	Pharmakokinetische Theorie	29
4.3.	Pharmakodynamische Theorie	30
5.	Multidrugtransporter (MDR)	31
5.1.	Biologische, genetische und biochemische Aspekte	31
5.2.	MDR1- Überexpression im Tiermodell für Epilepsie	33
5.3.	MDR1- Überexpression im epileptogenen Gewebe	34
5.4.	Medikamente als Substrat für MDR1	36
5.5.	MDR1- Polymorphismen	38
6.	Ziel und Zweck der vorliegenden Untersuchung	42
IV.	Spezieller Teil	44
1.	Patienten	44

1.1.	Durchführung	45
1.2.	Datenschutz	45
1.3.	Datenverarbeitung und Statistik	46
1.4.	Gestaltung des Fragebogens	46
2.	Methodik	49
2.1.	Isolierung von humaner genomischer DNA aus EDTA-Blut	49
2.2.	PCR zum Nachweis des MDR1- Polymorphismus in Exon 26	50
2.2.1.	PCR-Restriktionsverdau mittels SAU 3AI	51
2.2.2.	Analyse des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese	52
2.3.	ABI Prism Snapshot-Methode zum Nachweis der Polymorphismen in Exon 12 und 21 des MDR1 Gens	52
2.3.1.	Multiplex-PCR zur Amplifizierung des C1236T- und des G2677T/A- Polymorphismus	53
2.3.2.	Neutralisierung von überschüssigen dNTPs und Primern mittels EXO I	55
2.3.3.	Multiplex Snapshot Reaktion	56
3.	Ergebnisse	58
3.1.	Gesamtdarstellung	58
3.2.	Spezifische Darstellung unter Berücksichtigung des MDR1 Polymorphismus auf Exon 26	67
3.3.	Subgruppenanalyse der MDR1 spezifischen AED	77
3.4.	Haplotypenanalyse	78
V.	Diskussion	82
VI.	Zusammenfassung	94
VII.	Literaturverzeichnis	99
VIII.	Anhang	115
1.	Genetik-Terminologie	115
2.	Tabellen:	118
3.	Lebenslauf	123
4.	Danksagung	124

1. Abkürzungsverzeichnis

(englische Begriffe *kursiv*)

ABC	<i>ATP-binding cassette superfamily</i>
ACTH	Adrenocorticoïdes Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizithyperaktivitätssyndrom
ADR	<i>Adverse Drug Reaction</i>
AED	Antiepileptika
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosintri-phosphat
ATPase	Adenosintri-phosphatase
BB	Blutbild
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BNS-Anfälle	Blitz-Nick-Salaam-Anfälle (West-Syndrom)
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CBZ	Carbamazepin
CD ³⁴	<i>Cluster Determinants</i> (CD-Nomenklatur für Leukozytenantigene)
CO ₂	Kohlendioxid
CSWS	<i>Continuous Spike Waves During Slow Wave Sleep-Syndrome</i>
CYP450	Cytochrom P450
d	Tage
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNET	Dysembryoblastischer neuroepithelialer Tumor

EDTA	<i>ethylene-diamine-tetraacetic-acid</i> (Äthylendiamintetraessigsäure)
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
ESES	Elektroenzephalographischer Status epilepticus <i>during slow sleep</i>
ESM	Ethosuximid
ETP	Epilepsietypisches Potential
EZR	Extrazellulärraum
FBM	Felbamat
FCD	Fokale Kortikale Dysplasie
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	Gammaaminobuttersäure
GBP	Gabapentin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
kg	Kilogramm
kDA	Kilodalton
l	Liter
LEV	Levetiracetam
LRRP	<i>Lung-Resistance-Related-Protein</i>
LTG	Lamotrigin
MCT	Monocarboxylsäuretransporter
MDR	<i>Multidrugtransporter</i>

MEG	Magnetenzephalographie
mg	Milligramm
MHD	10,11-Dihydro-10-Hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepin-5-carboxamid
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
ms	Millisekunden
MTLE	mesiale Temporallappenepilepsie
MTS	Mesiale temporale Sklerose
MRP	Multidrug Resistance Protein
mV	Millivolt
MVP	<i>Major Vault Protein</i>
N.	Nervus (Nerv)
Na ⁺	Natrium
NW	Nebenwirkungen
OAT	organische Anionentransporter
OATP	organische Anionen-transportierende Polypeptide
OCT	organische Kationentransporter
OCTN1	organische Kationen/Carnitin Transporter
OXC	Oxcarbamazepin
PB	Phenobarbital
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEMA	Phenylethylmalonamid
PET	Positronenemissionstomographie
Pgp	P-Glykoprotein
PHT	Phenytoin
PRM	Primidon
PTT	Partielle Thromboplastinzeit (Gerinnungsmarker)
RNA	Ribonukleinsäure

RT-PCR	<i>Realtime-PCR</i>
SCN1A	Gen, welches die 1A-Untereinheit des spannungsabhängigen cerebralen Natriumkanals kodiert
SE	Status epilepticus
sec	Sekunden
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphismus</i>
SPECT	<i>Single-Photon-Emissions-Computertomographie</i>
SUDEP	Plötzlicher unerwarteter Tod bei Epilepsie (<i>sudden unexpected death in epilepsy</i>)
SV2A	Synaptisches Vesikelprotein 2A
TBP	TATA-Bindeprotein
TGB	Tiagabin
TLE	Temporallappenepilepsie
TPM	Topiramat
TS	Tuberöse Hirnsklerose
UPM	Umdrehungen pro Minute
VPA	Valproinsäure
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
ZNS	zentrales Nervensystem
ZOS	Zonisamid
μg	Mikrogramm

2. Abbildungsverzeichnis

Tabellen

- Tabelle 1: Klassifikation der ILAE von 1981
- Tabelle 2: Überblick über die AED, die als MDR1 Substrate diskutiert werden
- Tabelle 3: Überexpression von Multidrugtransportern in epileptogenem Hirngewebe
- Tabelle 4: MDR1-transportierte AED nach derzeitigem Wissenstand
- Tabelle 5: Nebendiagnosen in der Studien- und Kontrollgruppe
- Tabelle 6: Verteilung der C3435T-Polymorphismen des MDR1 bei Kaukasiern
- Tabelle 7: Wirksamkeit der AED in der Studien- und Kontrollgruppe
- Tabelle 8: Auftreten von Nebenwirkungen in der Studien- und Kontrollgruppe
- Tabelle 9: Nebenwirkungsarten in der Studien- und Kontrollgruppe
- Tabelle 10: Absetzungsgrund der AED in der Studien- und Kontrollgruppe
- Tabelle 11: Aufteilung der C3435T-Polymorphismen des MDR1 auf die Studien- und Kontrollgruppe
- Tabelle 12: Aufteilung der Geschlechter auf die verschiedenen C3435T-Polymorphismen des MDR1
- Tabelle 13: Ethnizität in den verschiedenen C3435T-Polymorphismen des MDR1
- Tabelle 14: Aufteilung der Epilepsiesyndrome auf die verschiedenen C3435T-Polymorphismen des MDR1
- Tabelle 15: Wirksamkeit der AED in den verschiedenen C3435T-Polymorphismen des MDR1
- Tabelle 16: Aufteilung der verschiedenen Nebenwirkungsarten auf die C3435T-Polymorphismen des MDR1
- Tabelle 17: Absetzungsgründe in den verschiedenen C3435T-Polymorphismen des MDR1

- Tabelle 18: Vergleich zwischen der CC- und der TT-Untergruppe des C3435T-Polymorphismus des MDR1
- Tabelle 19: Genotypenfrequenz von MDR1-Polymorphismen an Exon 12, 21 und 26
- Tabelle 20: Haplotypenfrequenz der Exons 12, 21 und 26 des MDR1
- Tabelle 21: Frequenz der Haplotypenkombinationen der Exons 12, 21 und 26 des MDR1
- Tabelle 22: Revidierte Klassifikation der Epilepsien und epileptischen Syndrome
- Tabelle 23: Subgruppenanalyse der von MDR1 transportierten AED in der Studien- und Kontrollgruppe

Abbildungen

- Abbildung 1: Prozentsatz an Patienten, die mit 1 – 4 oder mehr AED anfallsfrei werden
- Abbildung 2: Struktur des MDR1
- Abbildung 3: Ätiologien der Epilepsien in der Studienpopulation

II. Einleitung

Epilepsie ist eine Erkrankung, die weltweit ca. 50 Millionen Menschen betrifft ((23), (100)). Die meisten Patienten haben eine gute Prognose hinsichtlich Anfallsfreiheit. Es gibt jedoch trotz der Weiterentwicklung der medikamentösen Therapie immer noch 30% der Patienten, die nicht anfallsfrei werden ((22), (33), (99), (141),(148)). Vor allem die Temporallappenepilepsie (TLE) ist eine der häufigsten und therapieresistentesten Epilepsieformen. Dies schränkt nicht nur die individuelle Lebensqualität ein, z.B. Ausbildung, Partnerschaft etc., sondern hat auch Auswirkungen auf die Gesellschaft, z.B. das Gesundheitssystem, durch vermehrte Behandlungskosten, beschränkte Erwerbstätigkeit etc. (180).

Für die Wirksamkeit eines Medikamentes sind Umfang und Geschwindigkeit der Aufnahme des Wirkstoffes im Körper von entscheidender Bedeutung. Diese so genannte Bioverfügbarkeit hängt nicht nur von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Medikamentes ab. Die genetische Variabilität von Transportproteinen kann den Erfolg von Arzneimitteltherapien beeinflussen. Die Grundlage ist, dass jeder Mensch einzigartig bezüglich seiner genetischen Veranlagung und seiner sozialen Prägung ist. Ebenso ist die medikamentöse Therapie von der individuellen genetischen Ausstattung beeinflusst. Eine bestimmte Dosierung kann bei Patienten, die an der gleichen Krankheit leiden, aufgrund ihres unterschiedlichen Erbmaterials verschiedene Wirkung zeigen: Die Wirkpalette reicht von guter bis fehlender Wirkung mit verschiedenster Abstufung der Nebenwirkungen. Verantwortlich für diese individuellen Reaktionen sind im großen Maße genetische Variationen, so genannte Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms oder kurz SNPs) des medikamentenmetabolisierenden Enzymsystems sowie der Transporterproteine.

Bisher werden die genetischen Unterschiede der Patienten bei der Arzneimittelentwicklung und -therapie nur in Ausnahmefällen berücksichtigt. Medikamente werden in der Regel nur nach groben Kriterien wie Alter, Gewicht, Leber- und Nierenfunktion dosiert. Die Minimierung von Nebenwirkungen ist ein wichtiges ärztliches Ziel, hängt davon doch im entscheidenden Maße die *Compliance* des Patienten ab (93).

In den letzten Jahren wurden einige Studien publiziert, welche über Korrelationen von Genpolymorphismen mit dem klinischen Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie bzw. der Nebenwirkungsrate berichteten ((60), (86), (88), (181); (190); (207)).

Eine Theorie für die Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie ist die Beteiligung von Transportproteinen wie Multidrugresistance Protein 1 (MDR1). Dieses verhindert durch seinen Sitz an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und seine Funktion als Efflux-Pumpe einen wirksamen Spiegel im Gehirn bei therapeutischen Spiegeln im Blut. Siddiqui und Kollegen berichteten 2003 von einer beobachteten Assoziation des CC-Typs des C3435T Polymorphismus von MDR1, entsprechend der aktiveren Variante, mit einer pharmakoresistenten Epilepsie (165).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genpolymorphismen des Transporterproteins MDR1, C3435T, C1236T und G2677T/A von 231 epilepsiekranken Kindern des Epilepsiezentrum Vogtareuth im Zeitraum von Juli 2004 bis September 2005 untersucht.

Ziel der Studie war es, diese Genpolymorphismen auf eine mögliche Assoziation hinsichtlich Wirksamkeit und Verträglichkeit von Antiepileptika (AED) zu untersuchen. Bei einer positiven Assoziation könnte der entsprechende Polymorphismus als Screeningmarker verwendet werden. Bei Vorliegen desselben könnten sich neue Therapieoptionen ergeben. Der Patient könnte auf AED eingestellt werden, die nicht mittels MDR1 transportiert werden oder es müssten AED so hergestellt bzw. verpackt werden, dass sie von MDR1 nicht erkannt werden, z.B. mit Hilfe von Immunoliposomen oder Nanotechnik. Eine weitere Therapieoption wäre auch das Blockieren von MDR1 mittels Inhibitoren wie Verapamil ((110),(133)).

Sollte sich die Bedeutung von Genpolymorphismen des MDR1 in der Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie bestätigen, so wäre durch die oben genannten Therapieoptionen die Hoffnung gegeben, die 30% an pharmakoresistenten Epilepsien weiter zu senken.

III. Allgemeiner Teil

1. Epilepsie

1.1. Definitionen

Unter **Epilepsie** versteht man ein Krankheitsbild, welches durch rekurrende (mindestens 2) epileptische Anfälle gekennzeichnet ist, die nicht durch eine unmittelbar vorangehende erkennbare Ursache provoziert wurden. Treten mehrere Anfälle innerhalb von 24 Stunden auf, werden sie als ein einzelnes Ereignis gewertet. Personen, die nur Neugeborenenkrämpfe oder Fieberkrämpfe gehabt haben, sind von dieser Definition ausgeschlossen.

Unter einem **epileptischen Anfall** versteht man die klinische Manifestation von einer abnormen, paroxysmalen und exzessiven Entladung von Neuronenverbänden im Gehirn. Der Anfall ist charakterisiert durch plötzlich auftretende und vorübergehende Erscheinungsformen, welche eine Bewußtseinsänderung, motorische, sensorische, autonome oder psychische Ereignisse einschließen können und vom Patienten oder einem Beobachter wahrgenommen werden.

Der **Status epilepticus** ist ein einzelner epileptischer Anfall von mehr als 30 Minuten Dauer oder eine Serie von epileptischen Anfällen, in der der Zeitraum vom ictalen Ereignis bis zur Wiederherstellung der Funktion (Bewusstsein) des Patienten länger als 30 Minuten dauert.

Unter einem **Neugeborenenkrampfanfall** werden epileptische Anfälle, welche in den ersten vier Lebenswochen auftreten, verstanden.

Ein **Fieberkrampf** ist ein bei Fieber auftretender epileptischer Anfall im Kindesalter jenseits des 1. Lebensmonates in Verbindung mit einer fieberhaften Erkrankung, der nicht durch eine ZNS-Infektion ausgelöst wurde. Neugeborenenanfälle oder afebrile Anfälle dürfen zuvor nicht stattgefunden haben. Die Kriterien anderer akuter symptomatischer Anfälle dürfen ebenso nicht zutreffen.

(Definitionen nach ((3),(5))

1.2. Vorkommen und Häufigkeit

Inzidenz (Zahl der neu erkrankten Personen in einer bestimmten Population): bei Kindern ergibt sich eine mittlere Epilepsieinzidenz von 60/100.000 (55) bei Ausschluss von Neugeborenenanfällen, Fieberkrämpfen und einzelnen unprovozierten Anfällen. Bei Erwachsenen sinkt die Inzidenz auf ein Plateau von ca. 30 – 50/100.000 ab, um dann in höherem Alter wieder erheblich anzusteigen. Sie beträgt dann 100- 140/100.000 ((66), (149)).

Prävalenz (Zahl der Personen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt an der Krankheit erkrankt sind): 3-6/1.000 Kinder (55) und 6,3/1.000 Erwachsene (97). Im frühen Kindesalter überwiegen die generalisierten Epilepsien, um dann im Erwachsenenalter den fokalen Epilepsien zu weichen (50).

1.3. Ätiologie

In mehr als 50% der Fälle ist die Ursache der Epilepsie unklar (idiopathische oder kryptogene Epilepsie). Die Ursachen für symptomatische Epilepsien haben ein weites Spektrum von Hirnentwicklungsstörungen aufgrund genetischer Basis oder intrauteriner Schädigung, über metabolische oder toxische Ursachen, hypoxische Hirnschädigungen, Infektionen, Schädel-Hirn-Traumata, bis zu Neoplasien oder Hirninfarkten.

1.4. Pathogenese

Die komplette Pathophysiologie der Epilepsie ist bislang noch nicht entschlüsselt worden. Im Bereich epileptogener Neurone wurden jedoch folgende morphologische Veränderungen beobachtet.

Ein Verlust von Dendriten, eine Verminderung der Anzahl der *dendritic spikes* und eine relative oder absolute Vermehrung der Gliazellen. In der Summe führt dies zu einer starken Verminderung der synaptischen Kontakte; die daraufhin folgenden Kompensationsmechanismen führen zu einer Supersensitivität der teilweise deafferentierten Neuronen. Des Weiteren zeigen epileptogene Neurone eine Membranfunktionsstörung. Initial kommt es zu einem abnormen Calciumioneneinstrom und dadurch zur unspezifischen Öffnung weiterer Ionenkanäle

mit folgender schlagartiger Depolarisation. Dies wird durch einen Kaliumausstrom über eine Calcium-induzierte Öffnung spezifischer Kaliumkanäle beendet. Dadurch reichert sich aber im Extrazellulärraum Kalium an und führt zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials in Richtung Depolarisation und damit hin zu verstärkter Erregbarkeit des Neurons (210).

Bei Auftreten epileptischer Anfälle sind zwei Phänomene entscheidend beteiligt: die abnorm synchronisierten Neuronenpopulationen und die Hyperexzitabilität von Neuronen.

Zusammengefasst wirken sich nach Meldrum (118) folgende zelluläre und synaptische Defekte epileptogen oder iktogen aus:

- Primär neuronale Membrandefekte, die zu einer Instabilität des Ruhepotentials führen (wie oben beschrieben)
- Veränderung der Natriumkanäle
- Abnormalitäten der Kaliumkanäle
- Defekt in den spannungsabhängigen Calciumkanälen
- Mangel der Membran-ATPase (Energiemangel für die Natrium-Kalium-Pumpe)
- Primärer Defekt des inhibitorischen GABA-Systems
- veränderte Empfindlichkeit oder veränderte Verteilung der Rezeptoren für die inhibitorischen oder exzitatorischen Neurotransmitter.

Wie es von einem epileptischen Anfall zu einem Status epilepticus kommt, ist bislang pathophysiologisch noch unklar. Man geht davon aus, dass die inhibitorischen Mechanismen, die normalerweise zur Beendigung eines Anfalls führen, hier versagen.

Hinsichtlich der Epileptogenese sind die sehr komplexen Mechanismen noch weitestgehend unbekannt. Bestimmte neuropathologische Veränderungen wie z.B. die Hippokampusklerose oder kortikale Dysplasien scheinen eine Voraussetzung für die Chronifizierung der Epilepsie zu sein. Idiopathische Epilepsien hingegen

treten nur in einem gewissen Lebensalter auf und verschwinden dann wieder, was auf eine gewisse vulnerable Phase der Hirnentwicklung schließen lässt. Bei symptomatischen Epilepsien scheinen die Läsionen zu Veränderungen in der Reorganisation von neuronalen Netzwerken zu führen.

So beeinflussen das Lebensalter, das geschädigte Hirnareal, die Art der Schädigung und die genetische Disposition die Epileptogenese (167).

1.5. Klinik

Klinisch wird zwischen fokalen und generalisierten epileptischen Anfällen unterschieden:

Bei **fokalen Anfällen** ist der Anfallsursprung in umschriebenen Kortexregionen. Bei einfach-fokalen Anfällen bleibt das Bewusstsein erhalten. Es ist eingeschränkt bei komplex-fokalen Anfällen. Je nach involvierter Hirnregion ist das Erscheinungsbild des klinischen Anfalls unterschiedlich (motorische, sensorische, vegetative Symptome...). Der Übergang von einfach-fokalen zu komplex-fokalen und zu generalisierten tonischen, klonischen und tonisch-klonischen Anfällen ist möglich. Dieser führt dann zu einem Bewusstseinsverlust, indem die Entladungen auf die Hirnstrukturen übergreifen, die für das Bewusstsein entscheidend sind.

Die Klassifikation der epileptischen Anfälle erfolgt gemäß den Empfehlungen der „Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy“ (1) (s. **Tabelle 1**).

Fokale Anfälle:

- Einfach fokale Anfälle (das Bewusstsein ist erhalten):
 - Anfälle mit motorischen Symptomen
 - Anfälle mit sensiblen oder sensorischen Symptomen
 - Anfälle mit vegetativen Symptomen
 - Anfälle mit psychischen Symptomen
- Komplex fokale Anfälle (mit Bewusstseinsstörung):
 - einfach fokaler Beginn mit nachfolgender Bewusstseinsstörung
 - mit Bewusstseinsstörung von Anfang an
- Fokale Anfälle mit Entwicklung zu sekundär generalisierten Anfällen:
 - einfach fokale Anfälle mit Entwicklung zu generalisierten Anfällen
 - komplex fokale Anfälle mit Entwicklung zu generalisierten Anfällen
 - einfach fokale Anfälle, die sich über komplex fokale zu generalisierten Anfällen entwickeln

Generalisierte Anfälle:

- Absencen
- myoklonische Anfälle
- tonische Anfälle
- klonische Anfälle
- tonisch-klonische Anfälle
- atonisch (astatische) Anfälle

Nichtklassifizierbare epileptische Anfälle:

- Anfälle, die auf Grund unzureichender oder unvollständiger Daten nicht klassifiziert werden können oder bei denen eine Zuordnung nicht möglich ist

Tabelle 1: Klassifikation der ILAE von 1981

Generalisierte Anfälle reichen von isolierter Bewusstseinstörung (Absencen) bis hin zu generalisierten Konvulsionen des Körpers (tonisch-klonische epileptische Anfälle). Neben den fokalen und generalisierten epileptischen Anfällen können Anfälle auftreten, die sich weder in die eine noch in die andere Form klassifizieren lassen.

Eine schwerwiegende Erscheinungsform der Epilepsie ist der **Status epilepticus** (s. unter Definition), der sich klinisch verschiedenartig darstellen kann. Es gibt konvulsive und nicht-konvulsive Status epileptici, sowie einen bioelektrischen Status epilepticus, wie er z.B. für das ESES-Syndrom charakteristisch ist. Ein konvulsiver, z.B. tonisch-klonischer, Status epilepticus stellt klinisch einen Notfall dar, der der sofortigen intensivsten Behandlung zur Unterbrechung desselben bedarf, da er sonst mit einer hohen Mortalität und bleibenden neurologischen Ausfällen assoziiert ist. Von einer Reihe von Epileptologen wurde vorgeschlagen, die Klassifikation aufgrund der ictalen Semiotik der Anfälle aufzubauen ((113),(126)).

Neben der Klassifikation der Epilepsie der „Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy“ (1) gibt es noch die Klassifikation der Epilepsie und Epilepsiesyndrome von 1989 (2). Diese benutzt zur Aufteilung der verschiedenen Epilepsien zwei Merkmale: die Lokalisation (fokale und generalisierte Epilepsien) und die Ätiologie (idiopathisch, symptomatisch, kryptogen). Symptomatische Epilepsien zeigen bekannte Hirnläsionen als Ursache; idiopathische Epilepsien haben wahrscheinlich genetische Dispositionen als Ursache und bei kryptogenen Epilepsien ist die Ursache verborgen; es wird jedoch vermutet dass sie symptomatischer Ätiologie sind. (s.(2) und Tabelle 22).

1.6. Diagnose

Für die Diagnose der Epilepsie ist neben der Anamnese (die genaue Anfallsanamnese), der körperlichen Untersuchung einschließlich des neurologischen Status, die Durchführung von EEGs wichtig. In erster Linie ist die Diagnose einer Epilepsie jedoch eine klinische. Neben der Bestätigung bzw. dem Ausschluss, dass es sich bei den paroxysmalen Ereignissen um eine Epilepsie handelt, wird versucht, die Epilepsieform und falls möglich die Ursache näher zu klassifizieren, da dies Auswirkungen auf die Behandlung haben kann (s.u. Punkt 2).

Neben einem Wach-EEG werden zumeist auch provozierende Maßnahmen wie Hyperventilation, Photostimulation im Rahmen des Routine-EEGs und Schlafentzug für das Schlaf-EEG durchgeführt. Bei 30 – 50% der Patienten ohne epilepsietypische Potentiale (ETP) im Wach-EEG kommt es zur Aktivierung dieser im Schlaf-EEG (153). Das EEG kann interiktal ETPs in Form von generalisierten Spike-Waves oder Polyspike-Waves oder fokalen Spikes zeigen. Es können sich ictale Muster finden,

z.B. rhythmische Muster. Daneben gibt es die Möglichkeit von Verlangsamungen fokaler oder generalisierter Art als Ausdruck einer Hirnfunktionsstörung oder Hinweis auf eine läsionelle Schädigung.

Zum Ausschluss von Differentialdiagnosen (siehe dort) dienen unter anderem die Laborchemie, das Elektrokardiogramm (EKG), ggf. die Lumbalpunktion und die bildgebende Diagnostik wie Schädelsonographie oder Magnetresonanztomographie (MRT). Gemäß der ILAE Neuroimaging Commission 1997 (6) sollte ein MRT auch in folgenden Fällen durchgeführt werden:

- Verlust der Anfallsfreiheit während der Einnahme von AED
- Fehlende Anfallsfreiheit mit AED der 1. Wahl
- Nachweis eines fixierten fokalen Defizits bei der neuropsychiatrischen oder neurologischen Untersuchung
- Fokaler Beginn eines Anfalls auf Grund der Anamnese oder des EEGs (in jedem Lebensalter)
- Falls unklassifizierte oder generalisierte Anfälle im 1. Lebensjahr oder im Erwachsenenalter beginnen

Gerade im Rahmen der Abklärung einer epilepsiechirurgischen Interventionsmöglichkeit werden das höchstauflösende MRT, und die funktionelle Bildgebung, wie funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT), Positronenemissionstomographie (PET), Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT), Magnetenzephalographie (MEG) oder Magnetresonanzspektroskopie (MRS) zur Lokalisation der epileptogenen Läsion und ihrer Beziehung zu Hirnregionen mit höherer Funktion, wie z.B. Sprache oder Motorik, durchgeführt.

Sind die Differentialdiagnosen ausgeschlossen und steht die Diagnose Epilepsie, müssen vor dem Beginn der antikonvulsiven Behandlung einige Blutwerte, je nach dem einzusetzenden Medikament, bestimmt werden (wie z. B. Leber- und Nierenwerte, Amylase, Blutbild, Gerinnung etc.).

1.7. Differentialdiagnose

Differentialdiagnosen der Sturzanfälle sind Kataplexie, Drop attacks, synkopale Anfälle oder psychogene Anfälle. Bei Kindern müssen in die Differentialdiagnose der Epilepsie auch Affektkrämpfe, Apnoen und Zyanose bei gastroösophagealem Reflux, benigner paroxysmaler Schwindel des Kleinkindesalters, paroxysmale motorische Phänomene (Hyperekplexie, Tics oder Spasmus nutans), nächtliche bzw. schlafbezogene episodische Ereignisse (Pavor nocturnus, Schlafwandeln) und das Münchhausen-Syndrom und das Münchhausen- Syndrom-By-Proxy mit einbezogen werden. Des weiteren sollte an komplizierte Migräneformen gedacht werden ((167), (7)).

1.8. Verlauf und Prognose

Für die Mehrheit der Patienten ist der Verlauf der Epilepsie günstig. 40% werden durch die primäre Therapie anfallsfrei (167), 2/3 erreichen eine 5-Jahres-Remission 10 Jahre nach der Diagnosestellung. Prognostisch schlechte Faktoren sind früher Beginn der Anfälle (<1. Lebensjahr), hohe Anfallsfrequenz vor Therapiebeginn, Fieberkrämpfe in der Vorgeschichte, die Anfallsart (60% der therapieresistenten Epilepsiepatienten haben Partialanfälle) und eine strukturelle Hirnläsion ((99), (141)). Bei Patienten mit idiopathischen Epilepsien ist die Remissionsrate für die generalisierten Epilepsien höher als für die fokalen. 85% der Patienten mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und 80% der Absencenepilepsien waren nach 20 Jahren anfallsfrei, wohingegen nur 65% der komplex-fokalen Epilepsien anfallsfrei waren. Je jünger die Patienten mit einer idiopathischen Epilepsie waren, umso wahrscheinlicher wurden sie anfallsfrei (12).

Hinsichtlich der Mortalität ist diese bei Epilepsiepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 2-3-fache erhöht ((33),(65)). Des weiteren gibt es bei Epilepsiepatienten den plötzlich unerwarteten Tod bei Epilepsie (SUDEP), der nicht durch einen Unfall oder ein Trauma ausgelöst wird, nicht in Verbindung mit einem Status epilepticus steht und bei dem die Obduktion keinen Hinweis auf eine anatomisch-strukturelle oder eine toxikologische Ursache für den plötzlichen Tod gibt (124). Im Kindesalter stellt SUDEP ein sehr seltenes Ereignis dar (27).

2. Therapie

2.1. Allgemeiner Überblick

Die Behandlung einer Epilepsie bedarf eines multimodalen Konzeptes. Ein wichtiger Aspekt ist die Aufklärung und Beratung des Patienten und seines persönlichen Umfeldes. Damit lassen sich die Compliance des Patienten hinsichtlich seiner medikamentösen Therapie verbessern, anfallsauslösende Situationen, wie z.B. Schlafentzug, Alkohol o. ä. können vermieden werden und es ist ein wichtiger Schritt zur Krankheitsverarbeitung getan. Den Patienten wird gezeigt, wie ein Anfallskalender geführt wird, in welchem wichtige Aspekte wie Anfallsfrequenz, Intensität der Anfälle und Anfallsart für die medikamentöse Therapie notiert werden und der gleichzeitig verhaltenstherapeutischen Wert hat. Für Erwachsene (MOSES) und Kinder (FAMOSEs) wurden modulare Schulungsprogramme entwickelt und erfolgreich eingesetzt.

Die Pharmakotherapie hat als Ziel, die Anfallsfreiheit zu erreichen, mit keinen oder nur geringen Nebenwirkungen, ohne dass sie dabei die Ursache der Epilepsie heilt. Dabei unterscheidet man die Akuttherapie zur Unterbrechung eines akut auftretenden Anfalls von der Langzeittherapie.

In der **Akuttherapie** werden bevorzugt Benzodiazepine verwendet, da sie schnell die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überschreiten und die Wirkung dadurch schnell eintritt.

Dem gegenüber steht die **Langzeittherapie**. Vor deren Beginn sollten mit dem Patienten ausführlich die Vor- und Nachteile der medikamentösen Therapie erläutert werden.

Für eine medikamentöse Therapie wird man sich entscheiden bei einem hohen Wiederholungsrisiko für einen epileptischen Anfall. Abhängig von der Ätiologie, die das Risiko für einen erneuten epileptischen Anfall mitbestimmt, wird teilweise nicht sofort nach dem ersten epileptischen Anfall behandelt, sondern zunächst noch das Auftreten eines weiteren epileptischen Anfalles abgewartet.

Der Goldstandard der Pharmakotherapie ist die anfalls- und syndrombezogene Monotherapie in für den Patienten optimaler Dosierung. Dabei sind die

Pharmakokinetik, die Wirksamkeitsdaten, das Nebenwirkungsprofil, das Lebensalter des Patienten, Begleiterkrankungen und die Compliance des Patienten genauso zu berücksichtigen wie auch die mentale Entwicklung und eventuelle psychische Auffälligkeiten des Patienten und die Kosten der Therapie.

In der Polytherapie sollten möglichst AED miteinander kombiniert werden, die einen unterschiedlichen Wirkmechanismus zeigen und sich in ihren Nebenwirkungen nicht gegenseitig potenzieren. Deshalb sollten AED mit einem hohen Potential für pharmakokinetische Interaktionen möglichst nicht eingesetzt werden.

Bei der Kombination von Medikamenten gibt es verschiedene Möglichkeiten der Wirkung:

- additive Wirkung = Wirkung der Medikamente addieren sich
- supraadditive Wirkung = Wirkung der Medikamente potenzieren sich
- infraadditive Wirkung = Wirkung der Medikamente heben sich teilweise auf

Eine optimale AED-Kombination zeigt supraadditive Wirkung bei infraadditiven Nebenwirkungen.

Vor dem Beginn der antikonvulsiven Behandlung müssen diejenigen Blutwerte bestimmt werden, auf die das einzusetzende AED einen Einfluss haben kann (wie z. B. Leber- und Nierenwerte, Amylase, Blutbild, Gerinnung etc.).

Die Bestimmung des Serumspiegels des AED wird in Fachkreisen kontrovers diskutiert. Für die konventionellen AED (Phenytoin, Valproat etc.) gibt es aus langjähriger klinischer Erfahrung therapeutisch optimale Serumspiegel. Diese liegen für die neueren AED (z.B. Levetiracetam, Topiramat etc.) nicht vor. Daneben ist es noch nicht sicher, ob es eine enge Korrelation zwischen klinischer Wirkung und Serumspiegel gibt, so dass die neuen AED zu meist nach klinischem Ansprechen dosiert werden. Sollte der Medikamentenspiegel bestimmt werden, so geschieht dies als Nüchternspiegel vor der nächsten Gabe. Beim Auftreten von Nebenwirkungen zum Nachweis der Dosisabhängigkeit wird teilweise der Medikamentenspiegel bestimmt. Weitere Indikationen sind der Verdacht mangelnder Compliance, bei

eingeschränkter Resorption (z.B. Diarrhoe), bei fehlender Anfallsfreiheit und bei Medikamenteninteraktionen.

Bei länger bestehender Anfallsfreiheit, meistens ab zwei Jahren, kann daran gedacht werden das AED abzusetzen. Dabei sollten in die Entscheidung das Risiko für ein Anfallsrezidiv und dessen mögliche Auswirkungen auf das Leben des Patienten mit einbezogen werden. Die American Academy of Neurology hat nach Auswertung von 53 Studien, welche im Zeitraum von 1967 – 1991 publiziert worden waren, eine Anfallsrezidivrate für Erwachsene von 39% und für Kinder mit 31% berechnet. Die beste Prognose bezüglich Anfallsrezidiv nach Absetzen des AED hatten Patienten mit einer Anfallsfreiheit unter AED-Therapie von 2 – 5 Jahren, mit nur einem Anfallstyp (generalisiert oder fokal), mit einem normalisierten EEG, mit einem unauffälligen neurologischen Befund und normaler Intelligenz (4).

In der Behandlung von vor allem pharmakoresistenten Epilepsien kommen neben den Antiepileptika auch **Corticosteroide**, **Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)** und **Immunglobuline** sowie die **ketogene Diät** zum Einsatz. ACTH und Corticosteroide werden vor allem bei therapieschwierigen Formen des West-Syndroms (BNS-Anfälle), beim Landau-Kleffner-Syndrom und als Medikament der weiteren Wahl beim Lennox-Gastaut-Syndrom und beim Doose-Syndrom (myoklonisch-astatische Epilepsie) eingesetzt.

Péchaud und Kollegen beobachteten zufällig bei epileptischen Kindern, die eine allergische Rhinitis hatten, eine Verbesserung der Epilepsie durch intramuskuläre Immunglobulintherapie (129).

Bereits in den früheren Jahrhunderten fiel der positive Einfluss des Fastens auf die Anfallsfrequenz auf. Mittels der ketogenen Diät, einer fettreichen, kohlenhydrat- und eiweißarmen Diät wird eine anhaltende Ketose erreicht und der Effekt des Fastens nachgeahmt.

Eine weitere Säule in der Epilepsiebehandlung ist die **epilepsiechirurgische Option**. Lässt sich eine epileptogene Läsion ausmachen, besteht Pharmakoresistenz (s. u. 4) und eine nicht zu akzeptierende Auswirkung der Anfälle auf Kognition und Verhalten, sollte eine epilepsiechirurgische Behandlung erwogen werden.

Eine weitere Therapieoption stellt die **Implantation eines Schrittmachers des N. vagus** dar. Hierzu wird, wie bei einem Herzschrittmacher, unter die Haut der vorderen Thoraxwand ein elektrischer Stimulator implantiert, dessen Elektrode zum linken N. vagus im Halsbereich zieht. Über einen Magneten, der von außen aufgesetzt wird, und mit Hilfe eines Computers können Stromstärke, On-/Off-Zeiten, Impulsdauer und Signalfrequenz eingestellt werden (121).

2.2. Antiepileptika

Zur Behandlung der Epilepsie gibt es verschiedene AED. AED können je nach ihrer Wirkungsweise spannungsabhängige Ionenkanäle modulieren (z.B. Natrium-, Calcium- oder Kaliumkanäle), verstärkt an der Synapse hemmen (z.B. Verstärkung der Wirkung von GABA) oder die synaptische Erregung blockieren (z.B. Blockade der Glutamat-Rezeptoren).

Abhängig von dem Zeitpunkt Ihrer Zulassung wird zwischen „alten“ und „neuen“ AED unterschieden. Die so genannten „neuen“ AED wurden nach 1985 zugelassen und sind Felbamat (FBM), Gabapentin (GBP), Levetiracetam (LEV), Lamotrigin (LTG), Oxcarbazepin (OXC), Tiagabin (TGB), Topiramat (TPM) und Zonisamid (ZOS). Sie sind oft besser verträglich und zeigen weniger Interaktionen mit anderen AED.

Entsprechend der Themensetzung dieser Arbeit wird nachfolgend ausführlich auf diese AED eingegangen, die gemäß bisheriger Forschungsergebnisse von MDR1 transportiert werden ((31), (58), (73), (114), (116), (133), (134), (137), (144), (168)). Levetiracetam scheint laut Tierexperimenten kein Substrat für MDR1 zu sein (132). Für die nicht aufgeführten AED liegen bislang keine Berichte über den MDR1 Transport vor.

AED	Abkürzung	Wirkmechanismus	MDR1 Substrat	CYP450 Substrat
Carbamazepin	CBZ	Na ⁺	Ja ((133),(144),(168))	Induktor
Felbamat	FBM	Na ²⁺ , Ca ²⁺ , Blockade NMDA-Rezeptor	Ja (134)	schwach enzyminduzierend ((11),(59))
Gabapentin	GBP	noch nicht geklärt	Ja ((114),(168))	keine Enzyminduktion
Lamotrigin	LTG	Na ⁺ , Ca ²⁺ , hemmt Freisetzung von Aspartat und Glutamat	Ja (134)	Keine Enzyminduktion
Levetiracetam	LEV	Bindet an das Synaptische Vesikelprotein 2a (SVP 2A), Bedeutung für calciumabhängige Freisetzung von Neurotransmittern	Nein (132)	keine Enzyminduktion
Oxcarbamazepin	OXC bzw. OCBZ	Na ⁺	Ja (116)	keine oder nur schwache CYP450 Induktion ((11),(80),(95))
Phenobarbital	PB	Verstärkung der GABA-ergen Inhibition am Benzodiazepin- GABA _A - Rezeptor- Komplex	Ja (134)	CYP 450 Induktion ((11),(38), (143), (183))
Phenytoin	PHT	Na ⁺	Ja ((137), (144))	Enzyminduktor von CYP 450 ((11), (143),(183))
Primodon	PRM	Wie PB	Ja (134)	durch Metabolit PB ((143), (183))
Topiramat	TPM	Hemmung der glutamatabhängigen Exzitation, Na ⁺ , Hemmung der Carboanhydrase, Verstärkung der GABAergen Inhibition	Ja (168)	keine oder schwache Enzyminduktion (145)
Valproinsäure	VPA	noch nicht eindeutig geklärt; Verstärkung der GABA-ergen Transmission, Ca ²⁺ , Na ⁺ , inhibitorische Wirkung auf thalamokortikale Regelkreise	eventuell ((31), (58), (73))	keine oder schwache Enzyminduktion ((63), (62))

Tabelle 2: Überblick über die AED, die als MDR1 Substrate diskutiert werden

Legende: Ca²⁺ = Hemmung spannungssensibler Calciumkanäle; Na⁺ = Blockade der spannungssensiblen Natriumkanäle

3. Pharmakogenomik/ -genetik

3.1. Definition

Pharmakogenomik bedeutet die Erforschung des Genoms als Basis, um Unterschiede im Ansprechen auf Medikamente der einzelnen Individuen darzulegen (71). Das Genom besteht aus der gesamten Desoxyribonukleinsäure (DNA) und deren Produkten (Ribonukleinsäure (RNA) und Proteine). Unter Pharmakogenetik wird die Variabilität im Ansprechen auf Medikamente auf Grund erblicher Faktoren bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen verstanden (71). Der Begriff wurde erstmals in den 1950er Jahren verwendet ((34), (122)).

4. Pharmakoresistenz

4.1. Definition

Für die Pharmakoresistenz existiert keine präzise Definition (19). Die meisten Epileptologen definieren eine refraktäre Epilepsie im klassischen Sinne als das nicht vorhandene Ansprechen auf mindestens drei Antiepileptika (AED) der ersten Wahl für das Epilepsiesyndrom, welche entweder nacheinander oder in Kombination gegeben werden ((172), (139)). Ein Therapieversagen auf AED liegt dann vor, wenn entweder keine signifikante Reduktion oder gar ein Anstieg der Anfallsfrequenz unter einem AED, welches in einer ausreichenden oder tolerablen Dosis über eine ausreichende Zeit gegeben wurde, zu beobachten ist (139). Selbst wenn verschiedene Kriterien genutzt werden, so stimmen doch die meisten Autoren darin überein, dass ungefähr 30% der Epilepsiepatienten trotz richtiger Behandlung nicht in eine Anfallsfreiheit, die länger als 5 Jahre anhält, kommen ((99), (154)). Nach der National Institutes of Health Consensus Conference von 1990 sind zwischen 10% und 20% der Epilepsiepatienten pharmakoresistent. Auch die Entwicklung neuer AED hat an diesen Zahlen nichts geändert. Die Wahrscheinlichkeit, nach dem zweiten AED durch Einsetzen eines weiteren AED noch anfallsfrei zu werden, sinkt auf unter 10% ((131), (139)).

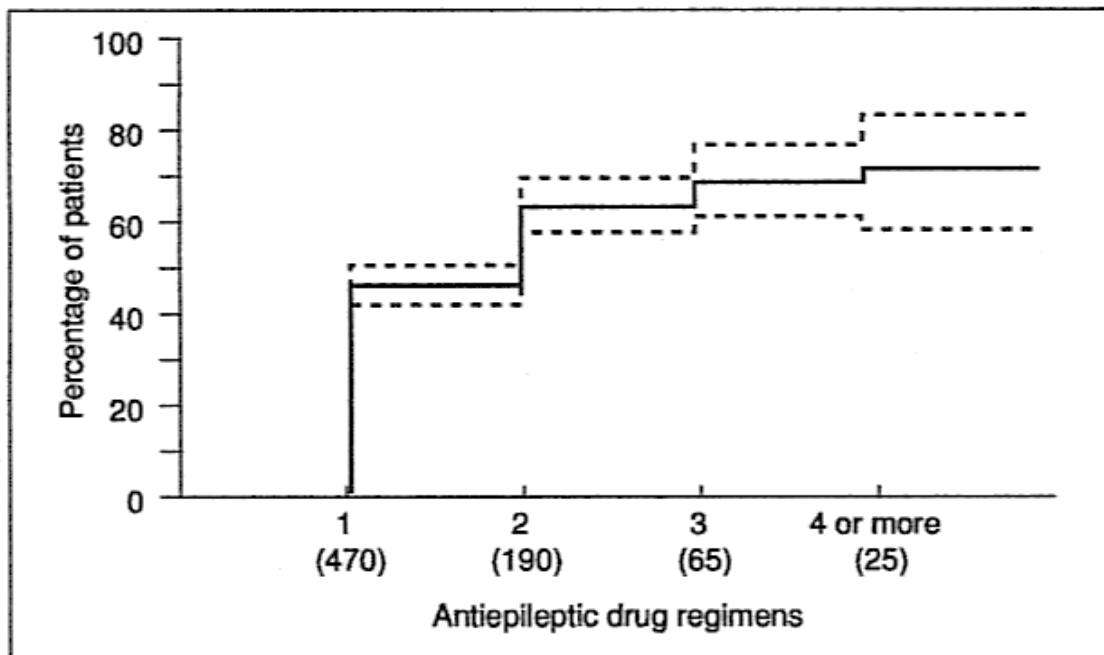


Abbildung 1: Prozentsatz an Patienten, die mit 1 - 4 oder mehr AED anfallsfrei werden (aus (48))

Prognostisch ungünstige Faktoren sind: früher Beginn der Anfälle (<1. Lebensjahr), hohe Anfallsfrequenz vor Therapiebeginn, Fieberkrämpfe in der Vorgeschichte, die Anfallsart (60% der therapieresistenten Epilepsiepatienten haben Partialanfälle) und eine strukturelle Hirnläsion ((99), (141)).

Es gibt verschiedene Muster der Pharmakoresistenz, die beobachtet wurden. Zum einen gibt es Patienten, die nie anfallsfrei werden. Eine weitere Patientengruppe zeigt Phasen der Remission, welche sich abwechseln mit Phasen unkontrollierter Anfälle. Die dritte Gruppe entwickelt im Verlauf der Therapie eine Pharmakoresistenz, nachdem die Anfälle zuerst gut zu kontrollieren waren (154). Die Mehrheit der pharmakoresistenten Patienten gehört nach Studienergebnissen der ersten Gruppe an, da (wie schon erwähnt) die Wahrscheinlichkeit, nach dem zweiten AED durch Einsetzen eines weiteren AED noch anfallsfrei zu werden, auf unter 10% sinkt (116). In einer Studie von Brodie und Kollegen entwickelten 9 % der Patienten mit einer neu diagnostizierten Epilepsie im Verlauf bei zunächst gutem Therapieansprechen auf AED eine Pharmakoresistenz (101).

Bevor ein AED als unwirksam und damit eine Therapieresistenz dafür angenommen wird, sollte überprüft werden, dass die Compliance des Patienten ausreichend war, die Diagnose richtig gestellt wurde und somit keine pseudo-refraktäre Epilepsie vorliegt.

Welche Mechanismen für die Entwicklung einer Pharmakoresistenz verantwortlich sind, ist aktuell noch nicht geklärt. Insgesamt liegt wahrscheinlich ein multifaktorieller Prozess vor (100). Es gibt verschiedene Hypothesen. Zum einen eine Abweichung der Ontogenese der Hirnreifung, zum anderen Epilepsie bedingte Veränderungen der Eigenschaften der Neurone, der Glia oder des neuronalen Netzwerkes, das Kindling-Phänomen oder eine Reorganisation des kortikalen Gewebes aufgrund einer Störung der Sauerstoffversorgung durch Anfälle ((67), (141)). Eine Epilepsie aufgrund einer zugrunde liegenden Hippokampussklerose und fokaler kortikaler Dysplasie ist häufiger mit einer Therapieresistenz assoziiert und legt nahe, dass das Ansprechen auf AED auch abhängig ist von der zugrunde liegenden Pathologie (100). Immer wieder auftretende Anfälle, z.B. im limbischen System, verursachen anhaltende Veränderungen, die ihrerseits bei einer unguten Kombination von Disinhibition und Hyperexcitabilität erneute Anfälle auslösen können. Dieses Modell könnte auch ein Phänomen für sekundäre Epileptogenese sein. Bei der Rasmussen Encephalitis wurden Auto-Antikörper gegen Glutamatsäuredecarboxylase gefunden, deren Bedeutung für die Refraktärität bislang noch nicht geklärt ist (100).

Um das Phänomen der Therapieresistenz zu erklären, werden derzeit hauptsächlich zwei verschiedene Hypothesen diskutiert, die Pharmakodynamische Theorie und die Pharmakokinetische Theorie.

4.2. Pharmakokinetische Theorie

In der Pharmakokinetischen Theorie ist die Hypothese, dass die AED nicht in ausreichender Konzentration den epileptischen Fokus erreichen ((110),(171)). Da pharmakoresistente Epilepsiepatienten den AED Blutspiegel im normalen therapeutischen Bereich haben, wird angenommen, dass die Permeabilität der BHS bei Pharmakoresistenz verändert ist (42). Substanzen überqueren die BHS mittels lipid-vermitteltem Transport von kleinen, nicht polaren Molekülen mittels freier (passiver) Diffusion oder mittels katalysiertem Transport (111). Ein Schwerpunkt der

pharmakokinetischen Theorie ist eine Veränderung des katalytischen Transportes im Sinne eines aktiven Ausflusses von AED durch die Überexpression von „Drug-Transporter-Proteinen“.

So konnten Tierversuche eine Hochregulation von Multidrug Resistance Protein (MRP) durch AED zeigen ((139), (155),(157)). Durch Kainat-induzierte Anfälle bei Ratten konnte eine Hochregulation der Expression von Drugtransportern in Astroglia und Kapillarendothelium gefunden werden ((139),(206)).

Bislang ist nicht geklärt, ob der erhöhte Spiegel von MDR1 bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten eine Konsequenz unkontrollierter Anfälle, der chronischen Behandlung mit AED oder eine Kombination der beiden ist.

4.3. Pharmakodynamische Theorie

Die Pharmakodynamische Theorie geht davon aus, dass Anfälle zu einer Veränderung der Ionenkanäle führen sowie der Rezeptoren für Neurotransmitter oder der Transporter oder der metabolischen Enzyme, welche in die Aufnahme, die Freisetzung oder die Verstoffwechslung der Neurotransmitter verwickelt sind (154).

So wiesen Brooks-Kayal et al. in einem Pilocarpin-Rattenmodell für Temporallappenepilepsie (TLE) nach, dass es nach einem abgelaufenen Status epilepticus (SE) zu einer veränderten Expression von Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kommt und damit zu einer Veränderung in der Funktion (24). Daraus könnte dann eine verminderte Sensitivität gegenüber Benzodiazepinen resultieren. Remy et al. konnten an Hirngewebe von Epilepsiepatienten und am Tiermodell zeigen, dass es dort zu einem Verlust des „use-dependent“ Blocks der Natrium-Kanäle kommt und damit zu einem Wirkungsverlust von CBZ (142).

Ein Nachteil dieser Theorie ist, dass sie nicht die Resistenz für AED mit unterschiedlichen Wirkmechanismen erklären kann, wie sie bei Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie vorliegt. Zusätzlich lieferten AED mit gleichem Wirkmechanismus (z.B. PHT, CBZ, LTG) unterschiedliche Ergebnisse (154).

5. Multidrugtransporter (MDR)

5.1. Biologische, genetische und biochemische Aspekte

1976 entdeckte Juliano bei der Erforschung der Multidrugresistenz in Krebszellen den Multidrugtransporter (85). MDR, auch P-Glykoprotein (Pgp) bezeichnet, ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches ein aktives Efflux-System darstellt. Er gehört zur ATP-binding cassette superfamily (ABC), daher auch als ABCB 1 bezeichnet. Bislang sind mindestens 48 ABC-Gene beim Menschen gefunden und in Gruppen eingeteilt worden, wie ABCA (ABC1), ABCB (MDR/TAP), ABCC (MRP/CFTR), ABCD (ALD), ABCE (OABP) und so fort. Mutationen in diesen Proteinen sind für eine Reihe genetischer Erkrankungen ursächlich z.B. MRP2-Mutation beim Dubin-Johnson-Syndrom (102).

MDR setzt sich aus zweimal sechs transmembranösen Abschnitten, zwei ATP-Bindestellen und einem N- und einem C-Ende zusammen (151) (s. Abbildung 2).

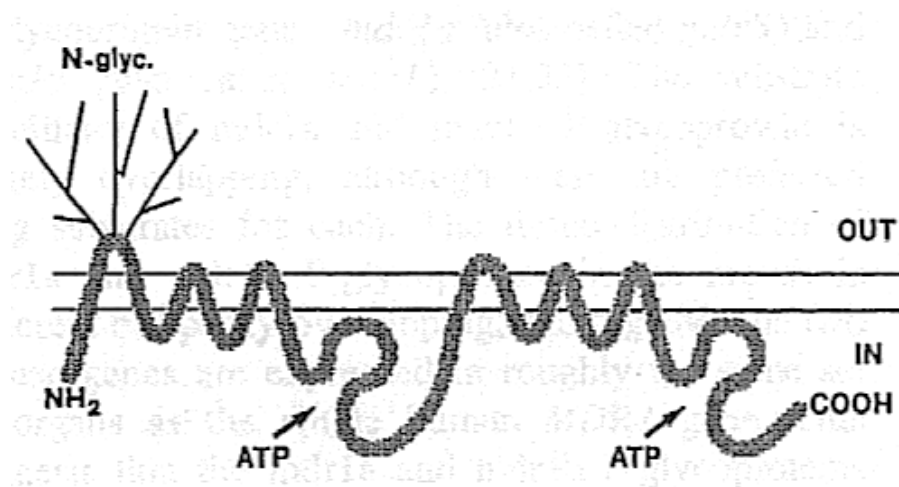


Abbildung 2: Struktur des MDR1 (aus (10))

Das MDR-Gen wird in zwei Klassen eingeteilt, die Klasse I Gen, welches den Drug-Transporter kodiert (bei Ratten *mdr1a* und *mdr1b*) und daneben das Klasse II Gen, welches für einen Phosphatidylcholin-Transporter in den Gallengängen kodiert. Pgp wird durch das MDR1-Gen auf Chromosom 7q²¹ kodiert (26), welches 28 Exone umfasst, ein Protein von 1280 Aminosäuren kodiert und aus 3843 Basenpaaren besteht. Sein Molekulargewicht beträgt 170 kDa ((41), (78)). Epithelzellen des unteren Gastrointestinaltraktes (Jejunum, Ileum und Colon), der Bürstensaum der Niere, Hepatozyten, die apikale Oberfläche der Pankreasgänge, in der Placenta, der

Nebennierenrinde, einige hämatopoetische Zellen, CD³⁴⁺-

Knochenmarkstammzellen, einige T-Zellen und Makrophagen, sowie die luminale Oberfläche des Kapillarendothels im Gehirn exprimieren MDR1 ((10), (18), (35), (40), (106),(128)).

Das Verteilungsmuster von MDR1 legt nahe, dass es eine physiologische Rolle in der Regulation des Eintritts bestimmter Stoffe in spezielle anatomische Kompartimente einnimmt (35) und so den Körper vor natürlich vorkommenden Toxinen und Xenobiotica schützt (83); in dem es diese aktiv aus der Zelle transportiert. Weitere Effluxtransporter neben MDR1 sind Multidrug Resistance Proteine (auch genannt Multidrug Resistance-Related oder – Assoziierte Proteine (MRP)), organische Anionentransporter (OAT), organische Anionen-transportierende Polypeptide (OATP), organische Kationen Transporter (OCT), organische Kationen/Carnitin Transporter (OCTN1) und Monocarboxylsäure Transporter (MCT). Neben der Überexpression von MDR1 an der BHS wurde auch eine Expression in Neuronen und parenchymalen Astrozyten festgestellt. Hier könnte MDR1 diese eventuell vor Apoptose schützen ((117), (154), (200)).

Die meisten Medikamente, die Substrate für MDR1 sind, haben ein Molekulargewicht von 400Da und sind hydrophob, amphipatisch, haben ein oder mehrere aromatische Ringe und sind teilweise bei physiologischem pH-Wert Katione ((78), (110)). Die Transmembrandomänen 5, 6 und 11, 12 sowie die extrazelluläre Schleife sind für die Interaktion mit den Medikamenten wichtig. Diese zwei Hälften bilden das Transportmolekül. Mittels ATP-Hydrolyse und 2 - 3 Molekülen ATP wird ein Molekül transportiert (10). Von einigen Forschern wurde postuliert, dass MDR1 seine Substrate anhand der Verteilung von Elektronen-Gebergruppen und der räumlichen Trennung erkennt (161).

Wie Inhibitoren wirken, ist bislang noch unklar. Es wird jedoch angenommen, dass die Hemmung kompetitiv geschieht ((54), (102)). Für MDR1 gibt es bislang drei Generationen von Inhibitoren. Cyclosporin A und Verapamil als unselektive Hemmer gehören der ersten Generation an. Es wurden in der zweiten Generation selektivere Hemmer für MDR1 entwickelt wie PSC 833 (= Valspodar; (186)), welche aber immer auch noch einen inhibitorischen Effekt auf Cytochrom P450 zeigten. Erst die dritte

Generation mit GF 120918 (49), VX710 (biricodar) oder Diarylimidazolabkömmlingen zeigten selektive Hemmung von MDR1 ohne Effekt auf die Metabolisierung (110).

Das MDR1 Gen wird auch durch Umweltfaktoren beeinflusst. So führt der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat, welcher eine wichtige Rolle in der Epilepsie einnimmt, zu einer Hochregulation der Expression von MDR1 ((112), (208)). Weiter wird MDR1 durch Hitzeschock (31), Sodiumbutyrat (106), Proteinkinase- C- Agonisten (30), Hepatocarcinogene ((25), (57)) und fokale Ischämien beeinflusst ((103), (147)).

5.2. MDR1- Überexpression im Tiermodell für Epilepsie

Im Kainat-induzierten Epilepsiemodell an Ratten war eine vorübergehende Überexpression von Pgp in Astroglia und weniger stark in kapillären Endothelzellen des Hippokampus zu beobachten (206). Auch Rizzi und Kollegen beobachteten im Tiermodell der Temporallappenepilepsie einen vorübergehenden Anstieg der Pgp-Expression in Kapillarendothelzellen, Astroglia und Neuronen (144). Daher wurde hier davon ausgegangen, dass eher die Anfallsfrequenz als die Epilepsie für die gesteigerte Expression von Medikamententransportern verantwortlich sei. Dies wäre dann in Einklang zu bringen mit einer hohen Anfallsfrequenz vor Therapiebeginn als Risikofaktor für eine pharmakoresistente Epilepsie. Kwan und Kollegen beobachteten eine Erhöhung der *mdr1a* RNA bis zu 7 Tage nach einem einzigen audiogenen Anfall in Hirnregionen, die in die Anfallspropagation involviert waren (Mittelhirn und Hirnrinde). Eine Beeinflussung durch ein Trauma oder durch Chemokonvulsantien als Ursache der Pgp-Erhöhung konnte bei den audiogenen Anfällen ausgeschlossen werden (103).

Eine Langzeitgabe von Phenobarbital, Phenytoin, Topiramat oder Lamotrigin führte bei Ratten nicht zu einer erhöhten Expression von MDR1 im Gehirn ((111), (159), (202)). Wang und Kollegen untersuchten in einem Kindling-Modell der Ratte die Expression von Pgp und stellten fest, dass der Kindling Prozess als Ausdruck der Epileptogenese, wie auch wiederholte Anfälle und AED die Expression von Pgp beeinflussten (203). Volk und Kollegen untersuchten die Pgp-Expression am Rattenmodell der Temporallappenepilepsie. Sie zeigten als erste, dass Ratten mit therapieresistenten Anfällen sich signifikant von Ratten, deren epileptische Anfälle gut zu behandeln waren, in der Pgp-Expression unterschieden. Unabhängig von

einer möglichen Kapillarproliferation oder der Anfallsfrequenz zeigten die therapieresistenten Ratten eine Überexpression von Pgp in den Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Dass die Pgp Überexpression sich unabhängig von der Anfallsfrequenz verhielt, unterstützt gleichzeitig die These von genetischen Polymorphismen in diesem Gen, z.B. in der Promoter Region, welche die Genexpression reguliert (199).

Die folgende Aussage von Löscher stellt die aktuelle Situation treffend dar:
„It is difficult to know whether the over-expression of multidrug-transporter in epileptogenic brain tissue is a major cause of resistance, or merely a secondary effect of disease, i.e. an epiphenomenon.” (110)

5.3. MDR1- Überexpression im epileptogenen Gewebe

Als Erster berichteten Tishler et al. (191) über eine gesteigerte Expression von MDR1 im Hirnparenchym von Epilepsiepatienten und postulierten, dass die Expression von Pgp auf Astrozyten zu einer niedrigeren AED-Konzentration im Gehirn intraparenchymal führen könnte. AED, welche ins Gehirn gelangen, würden über die MDR1-tragenden Astrozyten direkt zu den Endothelzellen transportiert. Von dort würde das Medikament dann direkt durch MDR1-exprimierende Kapillarendothelzellen ins Gefäßlumen zurückgeleitet. Dieses hätte Serumspiegel von AED im therapeutischen Bereich zur Folge, aber zu niedrige Konzentrationen um die epileptischen Neuronen und deshalb weiter kontinuierliche Anfälle und letztendlich eine Therapieresistenz zur Konsequenz.

Auch Sisodiya et al. berichteten über erhöhte Pgp-Expression in Gliazellen von Hirnproben von Patienten mit kortikaler Malformation, welche eine häufige Ursache therapieresistenter Epilepsien sind. Da hier die Patienten vor einem ersten epileptischen Anfall und einer Exposition von AED gestorben waren, kann von einer eher konstitutionellen als einer induzierten Überexpression des MDR1 ausgegangen werden (173).

Lazarowski et al. stellten einen Patienten mit Tuberöser Hirnsklerose (TS), therapieresistenter Epilepsie und Pgp-Expression in TS-Zellen vor, sowie gleichzeitig persistierend niedrigem PHT-Spiegel (105). Es wurde von einer erhöhten Expression

sowohl von MDR1 als auch von MRP2 bei therapieresistenten Epilepsiepatienten berichtet (42). MDR1 und MRP1 waren in reaktiven Astrozyten aus epilepsiechirurgischen Resektaten mit fokaler kortikaler Dysplasie (FCD), Dysembryoblastischem neuroepitheliale Tumor (DNET) und Hippokampussklerose erhöht ((8); (174), (175)). Diese Erhöhung fand sich nur in epileptogenem Gewebe und nicht in normalem Gewebe, was die neurotoxischen Nebenwirkungen unabhängig von dem Ansprechen auf AED erklären könnte ((111), (174), (175)).

Die Gruppe von Aronica untersuchte Gewebe von 16 Patienten mit Hippokampussklerose und fand eine Hochregulation von Pgp und MRP2 im Kapillarendothel, was eine verstärkte Barrierefunktion nahe legt (14). Eine intensive Antikörpermarkierung von Pgp konnten Lardizabal und Kollegen im Kapillarendothel, in kleinen Blutgefäßen und reaktiven Astrozyten im Gewebe von Patienten mit Hemisphärektomie bei Rasmussenencephalitis beobachten (104).

Kubota und Kollegen zeigten an Resektaten von 13 Patienten nach selektiver Amygdalo-Hippocampektomie eine diffuse Pgp-Expression nicht nur im Hippokampus, sondern auch im Parahippokampus. Mittels *Realtime-PCR* (RT-PCR) wurde ein erhöhter mRNA-Gehalt von MDR1, MRP1, MRP5 und MRP6 in Endothelzellen von Epilepsiepatienten dargestellt. Damit zeigten sich komplexe Expressionsveränderungen der Multidrugresistanceproteine nicht nur im Hippokampus, sondern auch im Parahippokampus und unterstützen weiter die MDR-Hypothese (96).

Marchi und Kollegen fanden MDR1 überexprimiert in Blutgefäßen, Astrozyten und Neuronen von therapieresistenten Epilepsiepatienten. Im Vergleich zu „normalen“ Astrozyten war der MDR1 vermittelte Medikamenten-Export in „epileptischen“ Astrozyten gesteigert, bei gleichzeitig dort verbessertem Zellüberleben in Anwesenheit von cytotoxischen Substanzen. Daher postulierten sie, dass MDR1 je nach Position im Gehirn unterschiedliche Rollen spielen könnte: Eine cytoprotektive Rolle durch Parenchymexpression und eine verminderte AED Penetration mittels Endothelzellüberexpression (117).

(s. Tabelle 3)

Multidrug-transporter (Protein oder Gen)	Epileptisches Hirngewebe von	Multidrugtransporter überexprimiert in			Referenz
		Kapillar-endothelzellen	Astrozyten	Neurone	
MDR1	Patienten	+	+	+	(8); (13), (42), (173), (174), (191)
	Ratten (Kainat)	+	+	+	(160), (198), (200), (206)
	Ratten (Pilocarpin)	?	+	+	(198)
	Ratten (Kindling)	+	?	?	(138), (200)
MRP1	Patienten	-	+	+	(13), (42), (174), (175)
MRP2	Patienten	+	+	?	(13), (42)
MRP3	Patienten	-	?	?	(42)
MRP5	Patienten	+	?	?	(42)
BCRP	Patienten	-	-	-	(176)

Tabelle 3: Überexpression von Multidrugtransportern in epileptogenem Hirngewebe (154)

5.4. Medikamente als Substrat für MDR1

Knockout-Mäuse für MDR1 zeigten in Studien erhöhte Aufnahme von lipophilen Medikamenten und konsekutiver Neurotoxizität ((152), (153)). Studien mit kultivierten Gehirnendothelzellen zeigten, dass Pgp potentiell in den Medikamententransport involviert ist (151). Medikamente wie Ivermectin, Loperamid oder Domperidone

fürten bei Abwesenheit von Pgp an der BHS zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber diesen Substanzen. Die einfachste Erklärung dafür wäre, dass MDR1 durch Verhinderung des Eintritts dieser Medikamente ins Gehirn auf der Ebene der Kapillarendothelzellen deren interstitielle Flüssigkeitskonzentration reduziert (151). Geschieht dies nicht, kommt es zu einer verstärkten Wirkung dieser Medikamente im ZNS.

Dass auch AED aktiv von MDR1 transportiert werden, konnte in Rattenmodellen belegt werden. Die ersten in vivo Daten für einen AED-Transport von Pgp aus dem Gehirn heraus gelangen Potschka et al. 2001 für PHT. Im weiteren Verlauf folgten Daten für die AED GBP, TPM, CBZ, PB, FBM und LTG als Substanzen für MDR1 ((133), (137), (138), (170); (168)) (s. Tabelle 4). Owen und Kollegen konnten anhand von *mdr1a/1b*-Knockout-Mäusen, Zellkulturen und Durchflußzytometrie keinen Transport von CBZ über MDR1 beobachten (127). VPA ist wahrscheinlich eher eine Substanz für MRP ((73), (110)).

MDR1-Transportiertes AED	Literatur
CBZ	(133), (144), (168); (170)
OXC	(116)
FBM	(134)
GBP	(114), (151)
LTG	(134)
PB	(134)
PRM	s. (134)
PHT	(137), (144); (197)
TPM	(168)
VPA ?	(56), (58), (73)

Tabelle 4: MDR1-Transportierte AED (nach derzeitigem Wissenstand) (154)

Legende: VPA als MDR1 Substrat noch nicht genau geklärt

Die Gruppe um van Vliet untersuchten an post-Status epilepticus (SE) Ratten den Einfluss von Pgp auf die Pharmakoresistenz von PHT. Sie konnten zeigen, dass eine fast vollständige Anfallskontrolle mit der Kombination PHT und eines spezifischen Pgp-Blockers (Tariquidar) erreicht werden konnte. Gleichzeitig zeigten sich eine Pgp-Hochregulation im epileptischen Gewebe (140 – 200% im Vergleich zu Kontrollen) und ein um 20% reduzierter PHT-Spiegel im Gehirn. Dies unterstützt weiter die

Hypothese, dass pharmakoresistente Epilepsiepatienten von einer AED-Behandlung in Kombination mit Pgp-Blockern profitieren könnten (196).

Um die Pgp-Hypothese bei Epilepsiepatienten weiter zu überprüfen, insbesondere ob eine verringerte extrazelluläre AED-Konzentration in den epileptischen Hirnregionen besteht, untersuchten Rambeck und Kollegen als erste 22 Epilepsiepatienten mittels intraoperativer Mikrodialyse. Anschließend wurde das epileptische Gewebe reseziert. Zum Vergleich wurden auch die AED-Spiegel im Liquor (Subarachnoidalraum) und im Serum bestimmt. Sie konnten die Hypothese wegen hoher intra – und interindividueller Variabilität der AED im Extrazellulärraum (EZR) nicht ausschließen, aber auch nicht unterstützen. Tendenziell zeigten sich aber niedrigere AED-Spiegel im EZR als im Liquor (140).

5.5. MDR1- Polymorphismen

Mickley et al. (119) berichteten als Erste von natürlicherweise vorkommenden Polymorphismen im menschlichen MDR1-Gen. Sie fanden zwei Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Exon 21 (G2677T) und 24 (G2995A). In den folgenden Jahren wurde das gesamte MDR1-Gen weiter sequenziert und nach anderen Polymorphismen gesucht. Dabei wurden unter anderem zwei synonyme SNPs gefunden: C1236 T in Exon 12 und C3435T in Exon 26 ((70), (91)). Ganze Gendeletionen, Single Nucleotide Deletionen oder Veränderungen der normalen Transkription wurden nicht beobachtet. Es zeigte sich, dass MDR1 in hohem Maße polymorph ist (28).

Der Polymorphismus im Exon 21, welches an der intrazellulären Seite des Pgp lokalisiert ist, ist eine nicht-synonyme Mutation, d.h. G wird entweder durch T (G2677T) oder durch A (G2677A) ersetzt und führt dann zu einem Aminosäureaustausch von Alanin im Kodon 893 (Ala 893) zu Serin oder Threonin. Im Gegensatz dazu führt die C→T Transversion bei 3435 in Exon 26 zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz und sitzt an einer so genannten wobble-Position. Interessanterweise sind G2677T/A und C3435T stark verbunden. Über 90% der Japaner (189), 62% der Europäischen Amerikaner (91) und 80% der kaukasischen Deutschen haben gleichzeitig diese beiden SNP. Trotz diesem engen *linkage disequilibrium* sind diese zwei SNPs G2677T/A und C3435T in ihrer

funktionellen Bindung zu anderen SNPs nicht identisch. So war G2677T/A ein positiver Prädiktor für die Entwicklung einer Tacrolimus Neurotoxizität, C3435T jedoch ein negativer Prädiktor. Sie legen damit einen funktionellen Unterschied der beiden SNPs nahe (205). Interessant wäre es zu erfahren, ob die drei großen Polymorphismen C1236T, G2677T/A und C3435T zu anderen polymorphen Positionen in regulierenden Stellen für den MDR1-Promoter in funktioneller Beziehung stehen (78).

C3435T wurde in allen ethnischen Bevölkerungsgruppen gefunden, zeigte aber erhebliche ethnische Unterschiede in der Frequenz (43 - 54% bei Kaukasiern; 34 – 63% bei Asiaten; 73 - 90% bei Afrikanern). Hinsichtlich des SNP G2677T/A im Exon 21 zeigen Kaukasier (57%) und Japaner (43%) eine ähnliche Frequenz, bei Indern zeigt sich mit 34% ein Trend zu leicht niedrigerer Frequenz.

Hoffmeyer et al. berichteten als erste davon, dass C3435T mit einem reduzierten intestinalen Pgp-Gehalt in Personen mit dem TT-Genotyp assoziiert sei (70). Diese Ergebnisse konnten in anderen Studien bestätigt werden. So war die MDR1 mRNA Expression in Leukozyten von Gesunden mit unterschiedlichen Genotypen an der Position 3435 am höchsten in der CC-Gruppe und am niedrigsten in der TT-Gruppe, mit Werten dazwischen in der Heterozygoten CT-Gruppe (68). Es ist dabei aber eher unwahrscheinlich, dass C3435T aufgrund seiner Lokalisation in einer nicht kodierenden nicht-Promoter-Region im MDR1-Gen direkt die MDR1 Expression beeinflusst. Weit wahrscheinlicher ist es, dass dieser Polymorphismus verknüpft ist mit bislang noch nicht identifizierten Veränderungen in der Region, die die Expression kontrolliert, wie z.B. Promoter/Enhancer Region oder Sequenzen, die wichtig für die mRNA Processierung sind.

Hierzu fanden Soranzo et al. (178) 3 Intronstellen des MDR1 Gens, die mit dem C3435T Polymorphismus assoziiert waren. An Intron IVS 26 + 80 fand sich eine T nach C Transition. Dies führte zu einem Verlust einer Bindestelle von Sp1, eines bekannten ABCB1 Regulators (38). Ein weiteres Intron fand sich an IVS 25 + 3050. Dort kam es zur G nach T Mutation und konsekutiv zu einer Generierung eines neuen TATA-Bindeproteins (TBP), welches die ABCB1 Transkription durch p53 ((125),(192)) hemmt. Die dritte Intronstelle war an Position IVS 25 + 5231. Dort

wurde ein T durch ein C ersetzt und schuf dadurch eine NF-AT-Bindestelle, die mit der gesteigerten Funktion des CC-Typs von C3435T assoziiert sein könnte. Diese Funktionsaussagen der Intronstellen beruhen allerdings auf bioinformatischen Analysen, die zu hohen Zahlen falsch positiver Aussagen führen können (178).

Auch Fellay et al. fanden eine Assoziation von TT-Genotyp und einer niedrigen MDR1-Expression (52) in HIV1-infizierten Patienten, während Siegmund et al. dies in nicht-krebsbefallenem Nierengewebe zeigen konnten (166).

Gegensätzliche Ergebnisse erzielten Nakamura et al. 2002. Sie fanden eine erhöhte Expression des MDR1 in Duodenumproben in der TT-Gruppe (123) wie auch Illmer et al. in Blastenproben von Akuter Myeloischer Leukämie (AML)-Patienten mit dem CC-Genotyp (Wildtyp). In der Studie von Illmer et al. zeigte sich aber auch, dass Patienten die homozygot für den Wildtyp an irgendeinem Locus in Exon 12, 21 oder 26 waren, eine signifikant niedrigere Überlebensrate mit einer höheren Rückfallrate hatten. Aufgrund der Aktivität von Pgp käme es zu einer reduzierten intrazellulären Konzentration von *anticancer drugs*. Zusammenfassend wurden in der Studie von Illmer unterschiedliche Pgp-Konzentrationen in unterschiedlichem Gewebe gemessen, mit der Hypothese der unterschiedlichen Genregulation in den verschiedenen Geweben bzw. Zellen (79).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde das Augenmerk auf verschiedene Patientengruppen mit Therapieresistenz gelegt. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem TT-Genotyp von Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs und einer klinisch kompletten Remission auf präoperative Chemotherapie festgestellt werden (86). Bei Patienten mit ulcerativer Colitis fand sich eine signifikant höhere Frequenz von T3435-Allelen und Homozygoten für das T-Allel gegenüber Kontrollen, so dass die Schwäche der Barrierefunktion des Darmes bei T3435-Personen diesen Genotyp empfänglicher für eine ulcerative Colitis macht (158). Auch in anderen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis trug ABCB1 zu Pharmakoresistenz bei (109).

Gegensätzliche Ergebnisse berichteten Morita und Kollegen. Sie konnten an LLC-PK1 Zellen keinen Einfluss von MDR1 Polymorphismen an den Positionen G2677T/A und C3435T gegenüber dem Wildtyp auf die Transporteigenschaften beobachten

(120). Die von Chowbay und Mitarbeitern durchgeführte Metaanalyse zeigte keinen herausragenden Einfluss des SNP C3435T auf die Pharmakokinetik von Digoxin oder die MDR1 mRNA Expression (32).

Bei Epilepsiepatienten untersuchten Siddiqui et al. den SNP C3435T bei 315 Epilepsiepatienten (200 therapieresistente Patienten). Therapieresistente Patienten hatten signifikant häufiger den CC-Genotyp, der TT-Genotyp trat signifikant häufiger in der Gruppe der *drug-responsive* Epilepsiepatienten auf (165). Tan et al. versuchten vergeblich dieses Ergebnis an 401 therapieresistenten Epilepsiepatienten und 208 Kontrollpatienten zu bestätigen (188). Auch Sills et al. fanden bei 230 therapieresistenten Epilepsiepatienten und 170 Kontrollpatienten keine Korrelation zum C3435T Polymorphismus (169). Kwan und Kollegen fanden in 746 Han Chinesen mit Epilepsie eine Assoziation des MDR1 TT-Genotyps mit einer pharmakoresistenten Epilepsie und auch Hung et al. zeigten einen Einfluß der MDR1 Polymorphismen G2677T und C3435T auf das Therapieansprechen bei Epilepsiepatienten ((75), (98))

Zimprich und Kollegen untersuchten bei 210 Patienten mit pharmakoresistenter TLE die drei SNPs in Exon 12, 21 und 26. Es fand sich ein starkes *linkage disequilibrium* zwischen diesen drei SNPs und von den acht möglichen Haplotypen-Kombinationen wurden nur drei Haplotypen mit einer Frequenz >3% beobachtet (CGC, TTT und CGT). Hierbei korrelierte der Haplotyp CGC mit der Pharmakoresistenz (209). Im Gegensatz dazu beobachteten Seo und Mitarbeiter bei therapieresistenten japanischen Epilepsiepatienten häufiger den TT-Genotyp des C3435T-Polymorphismuses und des G2677T/A-Polymorphismuses. Ebenso war der TTT Haplotyp von C1236T, G2677T/A und C3435T signifikant häufiger in der Gruppe der therapieresistenten Epilepsiepatienten. Die im Vergleich zu europäischen Ergebnissen widersprüchlichen Befunde wurden mit ethnischen Unterschieden erklärt. Einschränkend ist hier jedoch anzumerken, dass nicht alle Ergebnisse nach der Bonferroni Korrektur noch signifikant blieben (162).

6. Ziel und Zweck der vorliegenden Untersuchung

Die biologische Ursache für Pharmakoresistenz ist bislang ungeklärt. Neben dem Epilepsiesyndrom werden auch die Ätiologie und die morphologischen Veränderungen z.B. im Hippokampus oder auf der Ebene der Neurotransmitterrezeptoren in Betracht gezogen. In den letzten Jahren ist der Multidrugrezeptor MDR1 zunehmend in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Zunächst konnte hierdurch die Pharmakoresistenz bei Krebspatienten in einigen Fällen erklärt werden. Im weiteren Verlauf wurde diese Effluxpumpe auch an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert, es fand sich eine Überexpression im Hirngewebe von Epilepsiepatienten und einige AED waren Substrate für MDR1. Widersprüchliche Ergebnisse liegen vor bezüglich einer möglichen Assoziation von SNP des C3435T MDR1 mit Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten.

Hypothese:

Da der Phänotyp des Genpolymorphismus stark mit dem Genotyp korreliert (194), könnte durch Bestimmung des Genotyps eine Wirksamkeits- und/oder eine Verträglichkeitsabschätzung hinsichtlich der medikamentösen Therapie möglich sein. Idealerweise kann durch einen geeigneten Gentest die individuelle Ansprechrate vor Initiierung der Therapie besser abgeschätzt und so schwerwiegende Nebenwirkungen vermieden werden.

Korrelationen mit dem Outcome und Genotyp sind bei Therapien mit Antiepileptika wenig durchgeführt worden. Folglich sollte mit dieser Studie geprüft werden, inwieweit mit Bestimmung der genetischen Varianten im Medikamenten-Transporter MDR1 die Wirkung und die empfundenen Nebenwirkungen von antiepileptischen Therapien abgeschätzt werden können.

In Anlehnung an die Studie von Siddiqui und Kerb (165) sollten folgende Fragen geklärt werden:

Fragestellung:

- Können Korrelationen des Genotyps des Patienten mit Nebenwirkungen, der Wirkung und dem Outcome der Therapie gebildet werden?
- Würde eine Feststellung des Genotypes vor der Initiierung einer Langzeittherapie einen Benefit für den Patienten bedeuten?

IV. Spezieller Teil

1. Patienten

Im Zeitraum von Juli 2004 bis September 2005 wurden im Behandlungszentrum Vogtareuth, Abteilung Neuropädiatrie, Patienten für die Studie rekrutiert. Nach positivem Votum der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer erfolgte die genetische Untersuchung.

Einschlusskriterien waren Patienten mit laufender oder neu begonnener antiepileptischer Therapie in Monotherapien oder Kombi-Therapien.

Ausgeschlossen von der Untersuchung wurden Patienten mit gleichzeitig laufenden, die antiepileptische Therapie stark beeinflussenden medikamentösen Therapien, Patienten mit schweren chronischen infektiösen Erkrankungen wie Hepatitis oder HIV, bedeutenden Herz-, Lungen-Stoffwechselerkrankungen, die das *Outcome* und die Verträglichkeit von Medikamenten stark beeinflussen, maligne Erkrankungen, Polymedikation und Drogen- oder Alkoholmissbrauch.

Als Einschlusskriterien für die Patienten der Studiengruppe wurden folgende Punkte definiert:

- Vorbehandlung mit mindestens 3 AED ohne Anfallsfreiheit
- nicht anfallsfrei (mehrere Anfälle pro Woche)
- und/oder EEG zeigt Paroxysmen
- oder/und Z. n. epilepsiechirurgischem Eingriff

Für die Patienten der Kontrollgruppe mussten folgende Einschlusskriterien erfüllt sein:

- höchstens 3 AED und mit dem 3. AED musste anhaltende Anfallsfreiheit erreicht worden sein
- anhaltend anfallsfrei für mindestens 6 Monate
- EEG zeigt keine Paroxysmen

In der Studiengruppe konnten 160 Patienten rekrutiert werden (mittleres Alter: 11 Jahre; 91 Jungen); die Kontrollgruppe bestand aus 71 Patienten (mittleres Alter: 12,3 Jahre; 39 Jungen).

Die Daten wurden mittels eines standardisierten Fragebogens erhoben. Damit entspricht die Untersuchung einer erweiterten Anwendungsbeobachtung mit Laborkontrollen als retrospektive Kohortenstudie.

1.1. Durchführung

Nach Mitteilung durch das ärztliche Personal wurde die Patientenauswahl durch den Studienarzt durchgeführt. Die Eltern / gesetzlichen Vertreter erhielten einen Aufklärungsbogen, in dem Sie über Sinn und Zweck der Studie aufgeklärt und um Einverständnis gebeten wurden. Falls die Patienten im Schulalter waren und kognitiv in der Lage waren, die Studie zu verstehen, erhielten sie ebenfalls einen speziell für Kinder entworfenen Aufklärungsbogen. Bei Zustimmung wurde der Krankenstatus des Patienten erhoben und im Rahmen der Routineblutentnahme zusätzlich 2 – 4 ml EDTA-Blut für die genetische Untersuchung abgenommen. Der Patient bzw. die Eltern / gesetzlichen Vertreter erhielten einen anonymisierten Fragebogen, den sie, gegebenenfalls mit Hilfe des Arztes, ausfüllten und in dem Fragen zur Anamnese, Behandlung der Epilepsie und Wirkung bzw. Nebenwirkung gestellt wurden.

1.2. Datenschutz

Die Erfordernisse des Datenschutzes verlangen die Einrichtung getrennter Personendaten- und Parameterdateien. In einer getrennten Datei auf einem mobilen Datenträger (ZIP) wurden die Studiennummer, Name, Vorname, Buchstabencode zur Anonymisierung und Geburtsdatum erfasst. Auf den Fragebögen wurden nur die Studiennummer und das Geschlecht notiert. Die Parameterdatei beinhaltet die Studiennummer, Buchstabenabfolge und das Geburtsjahr. Somit waren die einzigen redundanten Daten die Studiennummer, der anonymisierte Buchstabencode und das Geburtsjahr, welche zur Vermeidung und Erkennung von Erfassungsfehlern bei der Auswertung wichtig sind. In der Aufklärung wurden alle Patienten bzw. Eltern/ gesetzlichen Vertreter über die Anonymität der Auswertung mit Vor- und Nachteilen informiert.

1.3. Datenverarbeitung und Statistik

Die Information der Fragebögen wurde in eine eigens erstellte Access-Datenbank eingegeben. Nach Abschluss der Erfassung wurden die anonymisierten Daten in Excel exportiert, mit den genetischen Daten gekoppelt und anschließend in das Statistikprogramm SPSS (Version 12) zur weiteren Auswertung überführt und ausgewertet.

Zur Überprüfung des Vorliegens eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen den verschiedenen MDR1-Polymorphismen wurden Vier-Feldertafeln erstellt und der χ^2 -Test, bei kleiner Fallzahl der Fisher-Exact-Test, mit dem Programm Instat 3 durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Wurde mehrere Testungen durchgeführt, wurde zur Vermeidung der Akkumulation des alpha-Fehlers die Korrektur nach Bonferroni durchgeführt.

Die Beschreibung der genetischen Assoziationen erfolgte in Relation zum Hardy-Weinberg- Gleichgewicht für genetische Untersuchungen an Populationen (s. Anhang für Definition).

1.4. Gestaltung des Fragebogens

Zur Erhebung der Daten wurde ein Fragebogen entwickelt, der die verschiedenen derzeit diskutierten Risikofaktoren für eine therapierefraktäre Epilepsie beinhaltete. Zusätzlich wurden allgemeine Fragen zur Familienanamnese, der familiären Herkunft bis in die zweite Generation zurück (da dies Auswirkungen auf die Verteilung von genetischen Polymorphismen haben kann), sowie die Medikamentenanamnese erhoben.

Insgesamt wurden 24 Fragen gestellt, die folgende Themen abdeckten:

- Geschlecht
- Gewicht

- Familie:
 - Herkunftsland: Vater, Mutter, Großeltern väterlicher und mütterlicherseits
 - Erbliche/chronische Erkrankungen in der Familie
 - Epilepsie/Fieberkrämpfe in der Familie
- Epilepsieanamnese des Patienten:
- Fieberkrämpfe in der Vorgeschichte
- Erstmanifestation der Epilepsie mit erstem Anfall
- Erstdiagnose Epilepsie
- Epilepsie-Syndrom
- Auf welches Medikament erfolgte eine Toleranzentwicklung?
- Veränderung der Anfallssituation durch Fieber oder Antibiotika?
- Begleiterkrankungen (z.B. Hochdruck, Diabetes, Asthma, ...)
- Aktuelle Therapie:
 - Aktuelle antiepileptische Therapie mg/Dosis/kgKG
 - Aktuelle Begleittherapie
- Bisher eingesetzte AED in tabellarischer Form inklusive
 - Dosis,
 - Spiegel,
 - Wirksamkeit (hier erfolgten die Angaben in 25% Stufen hinsichtlich Anfallsreduktion bzw. EEG-Verbesserung),
 - Nebenwirkungen,
 - Therapiezeitraum und Grund des Absetzens
- Besonderheiten aus der Vorgeschichte
- Genauere Beschreibung der Nebenwirkungen der AED
- Veränderungen von Blutbild oder Leberwerten

- Absetzungsgrund
- Sonstiges: eine Freitexteingabe war möglich

2. Methodik

2.1. Isolierung von humaner genomischer DNA aus EDTA-Blut

Humane genomische DNA wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen isoliert. Zunächst wurde die DNA an eine Silica-Gel-Membran gebunden, anschließend gewaschen und dann eluiert. Bei hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen, die den hydrierten Molekülen Wasser entziehen, wurden Nukleinsäuren an die Silica-Gel-Membran gebunden. Im nächsten Schritt wurden die Polysaccharide und Proteine, die nicht absorbieren konnten, entfernt. Die Nukleinsäure wurde nach einem Waschschrift unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

Lösungen:

- QiAmp DNA Blood Kit: Quiagen, # 51106

Zusätzlich wurden benötigt:

- 96 – 100% Ethanol
- 1,5 ml Reaktionsgefäße, DNA-frei (Biosphere Micro Tube/Sarstedt/ # 72.690200)
- Pipettenspitzen mit Filter (Sarstedt)
- Mikrozentrifuge (Biofuge Primo von Heraeus)
- Metallblock (Thermomixer comfort von Eppendorf)

Durchführung:

Die Proben und Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Reagenzien wurden entsprechend der Bedienungsanleitung des Kits vorbereitet und der Metallblock vortemperiert.

In ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 20 µl Qiagen Protease pipettiert und anschließend 200 µl EDTA-Blut zugegeben und mit 200 µl des Lysepuffers versetzt. Dieses Gemisch wurde für 15 sec. gevortext. Anschließend wurde der Probenansatz bei 56 °C 10 Minuten inkubiert, um die maximale Ausbeute zu bekommen. Zur Inaktivierung infektiösen Materials erfolgte eine weitere Inkubation bei 70 °C für 15

Minuten. Die Proben wurden zwei Minuten bei 8000 UPM zentrifugiert, bevor 200 µl Ethanol zugegeben wurde. Anschließend noch einmal für 15 sec. gevortext und zwei Minuten bei 8000 UPM zentrifugiert. Das Lysat wurde auf die QIAamp-Säule gegeben und zwei Minuten bei 8000 UPM zentrifugiert. Das Pellet wurde mitsamt dem Eppendorfgefäß verworfen und die Säule auf ein neues Collection-Tube gestellt. Die Säule wurde mit 500 µl Waschpuffer AW1 gewaschen und anschließend bei 8000 UPM für zwei Minuten zentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift über einem neuen Collection-Tube erfolgte mit 500 µl Waschpuffer AW2 und einer weiteren Zentrifugation bei 11990 UPM für drei Minuten. Im nächsten Schritt wurde die Säule in das 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und das Collection-Tube verworfen. Um die DNA auszulösen wurde 200 µl AE-Puffer (= Aqua dest) zugegeben, bei Raumtemperatur fünf Minuten inkubiert und im Anschluss zwei Minuten bei 8000 UPM zentrifugiert.

Die DNA befand sich nun in 200 µl AE-Puffer (= Aqua dest) und konnte bei 4° C bis zu sieben Tagen gelagert werden, für eine längere Lagerung bei -20° C.

2.2. PCR zum Nachweis des MDR1- Polymorphismus in Exon 26

Nachweis des C3435T Polymorphismus im Exon 26

Ein Fragment aus dem Exon 26 des MDR1-Gens wurde amplifiziert:

Reagenzien:

- Primer: MDR1 sense und MDR1 antisense (Metabion, # 2821002307)
- PCR-Master Kit (Roche, # 1636103)

PCR-Ansatz für eine Probe:

0,2 µg DNA	5,0 µl
PCR-Master	12,5 µl
Forward Primer: 5' TGTTTTTCAGCTG CTTGATGG 3' (100 pmol/µl)	0,05 µl
Reverse Primer: 5' AAGGCATGTATG TTGGCCTC 3' (100 pmol/µl)	0,05 µl
Aqua dest (vom Kit)	7,4 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Thermocycler PCR Programm:

1. 94° C 2 min
2. 94° C 30 sec
3. 60° C 30 sec
4. 72° C 30 sec
5. 72° C 7 min
6. 4° C Pause

Die Schritte 2 – 4 der PCR werden in insgesamt 35 Zyklen wiederholt. Damit ergibt sich ein Gesamtlauf der PCR von ca. 1h 20min.

2.2.1. PCR-Restriktionsverdau mittels SAU 3AI

Reagenzien und Geräte:

- Restriktions Endonuclease Sau3AI (Roche, # 709751)
- Thermocycler

Ansatz für Restriktionsverdau:

Aqua dest	12,25 µl
Puffer	2,5 µl
Sau3AI	0,25 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Für den Restriktionsverdau wurden 15 µl des Restriktionsmixes und 8 µl des PCR-Produktes gemischt und im Thermocycler bei 37° C über Nacht inkubiert.

2.2.2. Analyse des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese

Herstellung des Gels:

Für ein 4% Gel wurde 4g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1:50 verdünnt mit Aqua dest) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und das Ganze in der Mikrowelle aufgekocht. Für die Färbung wurde 20 µl Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) zugegeben. 80 ml dieser Lösung wurden in eine vorbereitete Kammer gegossen und es wurde gewartet, bis das Gel fest wurde. 10 µl des verdauten PCR-Produkts wurden mit 1 µl Ladepuffer (AppliChem) in die Kammer pipettiert. An die erste Position wurde 10 µl der *DNA-ladder* (2 µl *DNA-ladder* mit 8 µl TAE-Puffer verdünnt) in die Kammer pipettiert als Molekulargewichtsmarker.

Die Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde unter einer Spannung von 120 V (500 mA; 150 Watt) über 80 Minuten durchgeführt. Mittels UV-Licht erfolgte die Analyse und photographische Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente. Die Fragmentgröße konnte mittels eines mitgelaufenen Molekulargewichtsstandards (*DNA-ladder*) abgeschätzt werden.

2.3. ABI Prism Snapshot-Methode zum Nachweis der Polymorphismen in Exon 12 und 21 des MDR1 Gens

Die Bestimmung der anderen beiden Polymorphismen des MDR1 Gens auf Exon 12 und 21 erfolgte mittels der kommerziellen Mini-Sequenzierungsmethode, die von Turner und Kollegen 2002 genauer beschrieben wurde (193). Dabei handelt es sich um eine Methode, die auf der Verlängerung eines unmittelbar vor dem SNP gebundenen Primers mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide beruht. Diese Primärverlängerungsreaktion wird durch das ABI PRISM 310 Sequenzierungsgerät automatisch mittels Kapillarelektrophorese detektiert. Die damit erhaltenen Daten wurden dann mit Hilfe der Programme Genscan Analysis (Version 3.7) und Genotyper (Version 3.7) detektiert und ausgewertet. Die PCR-Primersequenzen der

beiden SNPs wurden mit dem Programm PRIMER des HUSAR Bioinformatics Lab (DKFZ, Heidelberg, Deutschland; <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/>) ermittelt.

2.3.1. Multiplex-PCR zur Amplifizierung des C1236T- und des G2677T/A-Polymorphismus

Reagenzien und Geräte:

- 10x PCR-Puffer
- dNTPs
- Taq Polymerase (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Für C1236T(rs1128503):
Vorwärts-Primer: 5'-CAGCTATTCGAAGAGTGGGC-3' (TibMolBiol, Berlin, Deutschland)
Rückwärts-Primer: 5'-CCCACAGCCACTGTTTCC-3' (TibMolBiol, Berlin, Deutschland)
- Für G2677T/A (rs2032582):
Vorwärts-Primer: 5'-TTGAAATGAAAATGTTGTCTGG-3' (TibMolBiol, Berlin, Deutschland)
Rückwärts-Primer: 5'-AAAAGATTGCTTTGAGGAATGG-3' (TibMolBiol, Berlin, Deutschland)
- Thermocycler

PCR-Ansatz für eine Probe:

DNA (50 ng/μl)	1 μl
10x PCR-Puffer	1 μl
dNTPs (2 mM)	1 μl
Units Taq Polymerase (5 U/μl)	0,1 μl
0,5 μM Vorwärts-Primer C1236T: 5'- CAGCTATTCTGAAGAGTGGGC-3' (20μM)	0,25 μl
0,5 μM Rückwärts-Primer C1236T: 5'- CCCACAGCCACTGTTTCC-3' (20μM)	0,25 μl
0,5 μM Vorwärts-Primer G2677T/A: 5'- TTGAAATGAAAATGTTGTCTGG-3' (20μM)	0,25 μl
0,5 μM Rückwärts-Primer G2677T/A: 5'- AAAAGATTGCTTTGAGGAATGG-3' (20μM)	0,25 μl
Aqua dest	4,9 μl
Gesamtvolumen	10 μl

Thermocycler PCR Programm:

1. 95° C 10 min
2. 95° C 30 sec
3. 60° C 30 sec
4. 72° C 1 min
5. 72° C 10 min
6. 4° C Pause

Die Schritte 2 – 4 der PCR werden in insgesamt 35 Zyklen wiederholt. Damit ergibt sich ein Gesamtlauf der PCR von ca. 1h 30min.

2.3.2. Neutralisierung von überschüssigen dNTPs und Primern mittels EXO I

Reagenzien und Geräte:

- SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA)
- EXOI (Exonuclease I) (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA)
- Aqua dest
- Thermocycler

Ansatz für eine Probe:

Aqua dest.	5,9 µl
SAP (1 Unit/ µl)	2,0 µl
EXO I (20 Unit/ µl)	0,1 µl
Gesamtvolumen	8 µl

Für den Verdau wurden 8 µl des Mixes zum PCR-Produkt gegeben und im Thermocycler bei 37° C für 60 Minuten inkubiert und anschließend die Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 72° C gestoppt.

2.3.3. Multiplex Snapshot Reaktion

Reagenzien:

- Ready Reaction Mix
- PCR-Ansatz aus 2.3.2
- Für C1236T(rs1128503):
Snapshot-Sonde: 5'-(GACT)₂-TCCTGGTAGATCTTGAAGGG-3'
(TibMolBiol, Berlin, Deutschland)
- Für G2677T/A (rs2032582):
Snapshot-Sonde: 5'-(GACT)₄-ATAAGAAAGAACTAGAAGGT-3'
(TibMolBiol, Berlin, Deutschland)
- SAP (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA)
- Aqua dest.
- Formamid
- GS120 Längenstandard (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Geräte:

- Thermocycler
- 41cm Kapillare (POP 4- Gel) (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ABI PRISM 310 Kapillarelektrophoresegerät

Multiplex Snapshot-Reaktionsansatz für eine Probe:

Ready Reaction Mix	0,5 µl
Inkubierter PCR-Ansatz aus 2.3.2	2,0 µl
1,5 µM Snapshot-Sonde C1236T: 5'-(GACT) ₂ -TCCTGGTAGATCTTGAAGGG-3') (100µM)	0,15 µl
1,5 µM Snapshot-Sonde G2677T/A: 5'-(GACT) ₄ -ATAAGAAAGAACTAGAAGGT-3' (100µM)	0,15 µl
Aqua dest	7,2
Gesamtvolumen	10 µl

Thermocycler Programm:

1. 96° C 10 sec
2. 50° C 5 sec
3. 60° C 30 sec

Die Schritte 1 – 3 werden insgesamt in 25 Zyklen wiederholt. Damit ergibt sich ein Gesamtlauf von ca. 20min.

Anschließend wurden nicht verbrauchte dNTPs wiederum durch enzymatischen Abbau entfernt. Hierzu wurden 0,5 Units SAP zum Multiplex Snapshot-Ansatz gegeben und dieser nochmals im Thermocycler bei 37° C für 60 Minuten inkubiert und anschließend die Reaktion durch 15 minütige Inkubation bei 72° C gestoppt.

Zu 0,5 µl dieses Ansatzes wurden 9,75 µl Formamid und 0,25 µl GS 120 Längenstandard gegeben und die Produkte der Primer-Extensionsreaktion in einer 41 cm Kapillare (POP 4-Gel) am ABI PRISM 310 Kapillarelektrophoresegerät aufgetrennt.

3. Ergebnisse

3.1. Gesamtdarstellung

Insgesamt konnten 231 Patienten (130 männlich (56,3%); mittleres Alter 11 Jahre 5 Monate) rekrutiert werden. Davon waren 160 Patienten (69,3%) in der Gruppe der Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie; 71 Patienten (30,7%) gehörten der Kontrollgruppe an. Die meisten Patienten hatten die Diagnose einer symptomatischen fokalen Epilepsie (55,4%), gefolgt von nicht näher zu klassifizierenden Epilepsien (19%), idiopathisch generalisierten (12,1%) und idiopathisch fokalen Epilepsien (8,7%). Bei 10 Patienten zeigten nur die EEGs pathologische Befunde, Anfälle waren nicht aufgetreten (s. Abbildung 3).

Die große Anzahl an Patienten mit einer symptomatisch-fokalen Epilepsie mag in der besonderen Inanspruchnahmepopulation unserer Klinik begründet sein. In das Epilepsiezentrum Vogtareuth kommen viele Epilepsiepatienten zur Abklärung eines epilepsiechirurgischen Eingriffes als therapeutische Option ihrer pharmakoresistenten Epilepsie, sie haben daher häufiger die Diagnose einer symptomatisch fokalen Epilepsie.

Ätiologie der Epilepsien

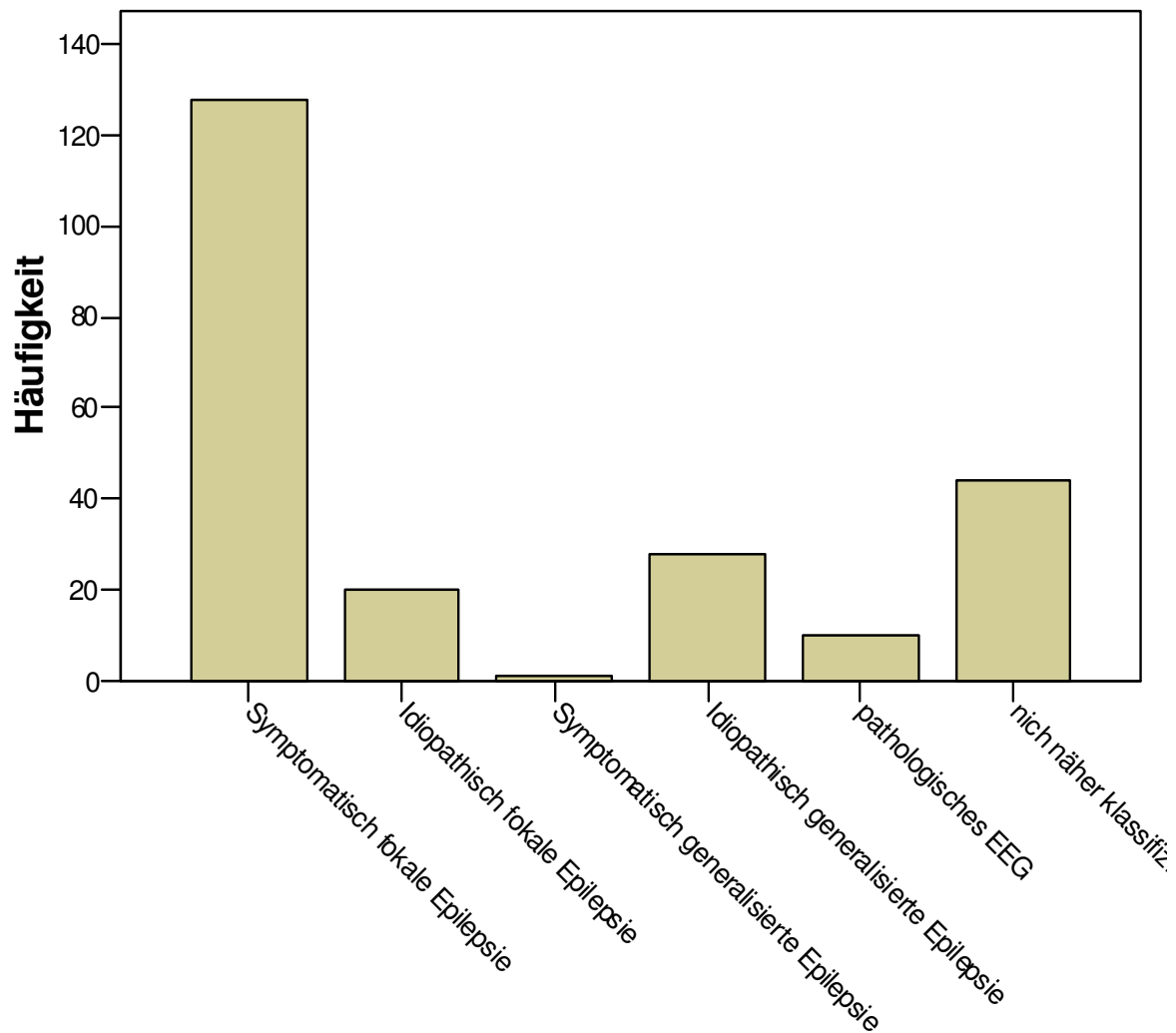


Abbildung 3: Ätiologien der Epilepsien in der Studienpopulation

An Nebendiagnosen zeigte sich oft ein globaler Entwicklungsrückstand von unterschiedlichem Schweregrad (26%), eine mentale Retardierung war bei weiteren 6,9% der Fall. Eine Hemiparese hatten 25 Patienten (10,8%), eine Tetraparese 19 Patienten (8,2%). Bei 15,6% der Patienten war ein epilepsiechirurgischer Eingriff durchgeführt worden. Diese wurden von vornherein in die Gruppe der pharmakoresistenten Patienten eingestuft.

Weitere Einschlusskriterien für die Gruppe der pharmakoresistenten Epilepsie waren:

- Vorbehandlung mit mindestens 3 AED ohne Anfallsfreiheit
- nicht anfallsfrei (mehrere Anfälle pro Woche) und/oder EEG zeigt Paroxysmen
- oder/und Z. n. epilepsiechirurgischem Eingriff

Weiter verteilten sich die Nebendiagnosen auf die beiden Gruppen pharmakoresistente Epilepsiepatienten versus Kontrollgruppe wie folgt (s. Tabelle 5): In der Gruppe der Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie hatten in Einklang mit der höheren Anzahl an symptomatisch fokalen Epilepsien die Patienten häufiger eine Hemiparese (4,0% vs. Ko.: 0,6%), eine FCD (2,5% vs. Ko.: 1,3%), einen Hydrozephalus (1,8% vs. Ko.: 0%) und einen abgelaufenen Status epilepticus in der Vorgeschichte (1,5% vs. Ko.: 0%). Dafür zeigten die Patienten der Kontrollgruppe häufiger Zeichen eines Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) (3,8% vs. PR.: 0,6%) oder eine Lese- und Rechtschreibschwäche (2,5% vs. PR.: 0,3%); eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Kinder mit einer Rolando-Epilepsie oder einem pathologischen EEG eher bei Entwicklungsauffälligkeiten behandelt werden.

Diagnosen	Studiengruppe (%)	Kontrollgruppe (%)	Gesamt (%)
Ehemaliges Frühgeborenes	11 (1,8%)	2 (1,3%)	13 (1,7%)
Allgemeiner Entwicklungsrückstand	72 (12%)	19 (12,1%)	91 (12%)
Intelligenzminderung	30 (5%)	7 (4,5%)	37 (4,9%)
Lese- und Rechtschreibschwäche	2 (0,3%)	4 (2,5%)	6 (0,8%)
Aufmerksamkeits- und Konzentrationsstörung	4 (0,7%)	6 (3,8%)	10 (1,3%)
Tetraspastik	20 (3,3%)	5 (3,2%)	25 (3,3%)
Hemiparese	24 (4%)	1 (0,6%)	25 (3,3%)
Ataxie	3 (0,5%)	1 (0,6%)	4 (0,5%)
Motorische Störung	2 (0,3%)	2 (1,3%)	4 (0,5%)
Hemianopsie	8 (1,3%)	0	8 (1,1%)
Minderwuchs	2 (0,3%)	1 (0,6%)	3 (0,4%)
Mikrozephalie	5 (0,8%)	2 (1,3%)	7 (0,9%)
Verhaltensauffälligkeit	7 (1,2%)	0	7 (0,9%)
Adipositas	7 (1,2%)	5 (3,2%)	12 (1,6%)
Eisenmangelanämie	1 (0,2%)	1 (0,6%)	2 (0,3%)
Z. n. Hirnblutung	8 (1,3%)	0	8 (1,1%)
Z. n. Meningoenzephalitis	14 (2,3%)	1 (0,6%)	15 (2%)
Z. n. Hirninfarkt	7 (1,2%)	0	7 (0,9%)
Z. n. Hirntumor	9 (1,5%)	0	9 (1,2%)
Hydrozephalus	11 (1,8%)	0	11 (1,5%)
Z. n. Anoxische Hirnschädigung	11 (1,8%)	5 (3,2%)	16 (2,1%)
Z. n. Status epilepticus	9 (1,5%)	0	9 (1,2%)
FCD	15 (2,5%)	2 (1,3%)	17 (2,2%)
Hippokampusklerose	2 (0,3%)	0	0 (0,3%)
Z. n. epichirurgischem Eingriff	36 (6%)	0	36 (4,7%)
keine Angaben	281 (46,8%)	93 (59,2%)	374 (49,3%)
Gesamtangaben	601 (100%)	157 (100%)	758 (100%)

Tabelle 5: Nebendiagnosen in der Studien- und der Kontrollgruppe

Im Mittel waren die Patienten bei der Erstmanifestation ihrer Epilepsie (hier definiert als 1. epileptischer Anfall) 3,5 Jahre (=168 Wochen) alt. Dies spiegelt unsere

besondere Patientengruppe mit *childhood-onset epilepsy* wieder. Bei 182 (78,8%) Patienten war die Diagnose einer Epilepsie im Anschluss an die Erstmanifestation gestellt worden.

Risikofaktoren für eine pharmakoresistente Epilepsie (s. (141)) i. S. von Fieberkrämpfen in der Vorgeschichte, Epilepsieerkrankung in der Familie, einer FCD hatten folgende Patienten:

- Fieberkrampf in der Anamnese: 15,6%
- Epilepsie in der Familie: 33,8%
- FCD: 6,9%

Erbkrankheiten, i. S. von Herz-Kreislaufferkrankungen, Krebsleiden etc. traten in Familien von 88 Patienten (38,1%) auf.

Eine komplette deutsche Herkunftsfamilie bis in die Großelterngeneration hatten 78,8%. Weitere Hauptabstammungsländer waren Österreich (3,6%) und die Türkei (5,4%).

Studien	CC-Typ	CT-Typ	TT-Typ
Cascorbi et al.	20,8%	50,5%	28,6%
Siddiqui et al.	20,6%	55,3%	24,2%
von Stülpnagel	19,5%	48,5%	32,0%

Tabelle 6: Verteilung der C3435T-Polymorphismen des MDR1 bei Kaukasiern (Cascorbi et al. und Siddiqui et al. und in unserer Studienpopulation)

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich zeigte unsere Studienpopulation Häufigkeitsverteilungen wie sie bei Kaukasiern beschrieben wurden (s. (28),(78), (165), Tabelle 6) und damit keine signifikante Abweichung der Verteilung der Polymorphismen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Im Mittel hatten die Patienten fünf AED (0 – 27) erhalten. Die Patienten in der therapieresistenten Gruppe hatten im Mittel 6,5 AED erhalten, in der Kontrollgruppe 1,5 AED. Die mittlere Behandlungsdauer mit einem AED betrug 11,1 Monate und unterschied sich in der Studiengruppe, in der ein größerer Wechsel der AED stattfand, mit 9,9 Monaten deutlich zur Kontrollgruppe mit 22,4 Monaten.

Bezüglich der Wirksamkeit der Medikation konnten 506 Angaben zu verschiedenen AED-Therapien der Patienten ausgewertet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Nebenwirkungen und auch die Effektivität der Therapie durch die Patienten angegeben wurden (s. Tabelle 7), der Therapieeffekt im Hinblick auf Therapiemodifikation/Absetzungsgrund wurde aber auch durch den behandelnden Arzt zusätzlich zum Patienten eingeschätzt (s. Tabelle 10). Dies und die retrospektive Erhebung führten zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen, wie im Folgenden aufgeführt.

Insgesamt wurde in 29,2% eine Wirkungslosigkeit der AED angegeben. Demgegenüber gab es in 15,6% der Fälle eine Anfallsfreiheit bzw. EEG-Sanierung und bei 8,5% der Patienten eine Reduktion der Anfallsfrequenz bzw. EEG-Verbesserung um mindestens 50% (s. Tabelle 7). Zu beachten ist hierbei jedoch auch, dass die Hälfte der Patienten in der Kontrollgruppe (52,5%) keine Angaben über die Wirksamkeit der Medikamente machten, im Vergleich zu etwas über einem Drittel in der Studiengruppe (38,4%) (s. Tabelle 7).

In 21,6% der Fälle war eine Toleranzentwicklung beobachtet worden. Dabei bestand ein statistisch extrem signifikanter Unterschied zwischen der Toleranzentwicklung in der Studiengruppe (27,5%) und bei den Kontrollen (8,5%) ($p=0,0009$; Odds Ratio: 4,109; 95% CI: 1,661 – 10,164).

	Studiengruppe (%)	Kontrollgruppe (%)	Gesamt (%)
Wirkungslosigkeit	131 (29,4%)	17 (27,9%)	148 (29,2%)
25% Anfallsreduktion	20 (4,5%)	5 (8,2%)	25 (4,9%)
50% Anfallsreduktion	41 (9,2%)	1 (1,6%)	42 (8,3%)
75% Anfallsreduktion	8 (1,8%)	0	8 (1,6%)
Anfallsfreiheit	68 (15,3%)	6 (9,8%)	74 (14,6%)
50% EEG-Sanierung	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)
100% EEG-Sanierung	5 (1,1%)	0	5 (1%)
Keine Angaben	171 (38,4%)	32 (52,5%)	203 (40,1%)
Gesamt	445 (87,9%)	61 (12,1%)	506 (100%)

Tabelle 7: Wirksamkeit der AED in der Studien- und Kontrollgruppe (die Prozentangaben in Klammern beziehen sich in der ersten Spalte auf die Studiengruppe, in der zweiten Spalte auf die Kontrollgruppe und in der letzten Spalte auf die Gesamtzahl). Zu beachten ist das in der Kontrollgruppe 52,5% der Patienten keine Angaben machten.

Nebenwirkungen waren in 493 Fällen (97,4%) von 506 Medikamentenangaben berichtet worden. Hinsichtlich des Auftretens von Nebenwirkungen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (s. Tabelle 8).

Nebenwirkung Medikation	Studiengruppe	Kontrollgruppe	Gesamt
Keine NW	13 (2,9%)	0	13 (2,6%)
NW	432 (97,1%)	61 (100%)	493 (97,4%)
Gesamt	445 (87,9%)	61 (12,1%)	506 (100%)

Tabelle 8: Auftreten von Nebenwirkungen in der Studien- und Kontrollgruppe

Die häufigsten NW waren Störungen des ZNS (59,5%) vor allem Müdigkeit (19,2%) aber auch Kognitionsverschlechterung, Verhaltensstörungen, Ataxie etc.. Gefolgt von gastrointestinalen NW (14,6%). Allergische Reaktionen wurden in 7,3% beobachtet (s. Tabelle 9). Dabei wurden in der Kontrollgruppe häufiger Müdigkeit, und dadurch auch häufiger ZNS-Nebenwirkungen, sowie allergische Reaktionen im Vergleich zur Studiengruppe angegeben. Die Studiengruppe klagte häufiger über gastrointestinale NW und Anfallsverschlechterung als die Kontrollgruppe. Auch beobachtete nur die Studiengruppe eine Gewichtszunahme als NW.

Als schwere NW wurden die NW in 34,8% der Fälle gewertet.

Nebenwirkungsarten	Studiengruppe (%)	Kontrollgruppe (%)	Gesamt (%)
ZNS-NW	258 (58,0%)	43 (70,5%)	301 (59,5%)
Müdigkeit	76 (17,1%)	21 (34,4%)	97 (19,2%)
Anfallsverschlechterung	49 (11,0%)	3 (4,9%)	52 (10,3%)
EEG-Verschlechterung	6 (1,3%)	0	6 (1,2%)
Gastrointestinale NW	68 (15,3%)	6 (9,8%)	74 (14,6%)
Allergische Reaktionen	30 (6,7%)	7 (11,5%)	37 (7,3%)
Blutwerte (Elektrolyte, Gerinnung)	39 (8,8%)	5 (8,2%)	44 (8,7%)
Gingivahyperplasie	7 (1,6%)	0	7 (1,4%)
Hirsutismus	4 (0,9%)	0	4 (0,8%)
Gewichtszunahme/Adipositas	37 (8,3%)	0	37 (7,3%)
EKG-Veränderungen, Kardiomyopathie	2 (0,45%)	0	2 (0,4%)
Gesamt	445 (87,9%)	61 (12,1%)	506 (100%)

Tabelle 9: Nebenwirkungsarten in der Studien- und der Kontrollgruppe (die Prozentangaben in Klammern beziehen sich in der ersten Spalte auf die Studiengruppe, in der zweiten Spalte auf die Kontrollgruppe und in der letzten Spalte auf die Gesamtzahl)

Die Antiepileptika wurden in den meisten Fällen wegen auftretender Nebenwirkungen (43,1%), Anfallspersistenz (22,3%) oder Wirkungslosigkeit (13,4%) abgesetzt (s. Tabelle 10). Wobei Anfallspersistenz eine leichte Reduktion der Anfallsfrequenz < 50% bedeutet, gegenüber gänzlich fehlendem therapeutischen Effekt bei Wirkungslosigkeit. Beachtenswert ist der hohe Wert für die Angabe Anfallspersistenz in der Kontrollgruppe mit 37,7%, so dass möglicherweise auch unsere Kontrollgruppe nicht die einfachste zu behandelnden Epilepsieformen hatte, aber anhand der Einschlusskriterien die Vorgaben für die Kontrollgruppe erfüllte.

Medikation Absetzungsgrund	Studiengruppe	Kontrollen	Gesamt
Wirkungslosigkeit	59 (13,3%)	9 (14,8%)	68 (13,4%)
Anfallspersistenz	90 (20,2%)	23 (37,7%)	113 (22,3%)
Wirkverlust	34 (7,6%)	5 (8,2%)	39 (7,7%)
Anfallsfreiheit	8 (1,8%)	4 (6,6%)	12 (2,4%)
Status epilepticus	11 (2,5%)	1 (1,6%)	12 (2,4%)
keine Angaben	32 (7,2%)	7 (11,5%)	39 (7,7%)
Nebenwirkungen	206 (46,3%)	12 (19,7%)	218 (43,1%)
Therapieänderung	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)
OP-Vorbereitung	3 (0,7%)	0	3 (0,6%)
post-operativ	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)
Gesamt	445 (87,9%)	61 (12,1%)	506 (100%)

Tabelle 10: Absetzungsgrund der AED in der Studien- und Kontrollgruppe (die Prozentangaben in Klammern beziehen sich in der ersten Spalte auf die Studiengruppe, in der zweiten Spalte auf die Kontrollgruppe und in der letzten Spalte auf die Gesamtzahl)

3.2. Spezifische Darstellung unter Berücksichtigung des MDR1

Polymorphismus auf Exon 26

Die Kernfrage, ob ein signifikanter Unterschied zwischen dem TT-Polymorphismus und dem CC-Polymorphismus des C3435T in der Gruppe der Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie besteht und damit einen Prognosefaktor darstellt, kann anhand unserer Daten nicht bestätigt werden. Sowohl in der TT-Gruppe als auch in der CC-Gruppe betrug die Häufigkeit des Polymorphismus in der Pharmakoresistentengruppe fast identisch 67,6% vs. 66,7% und zeigte damit keinen statistisch signifikanten Unterschied (s. auch Tabelle 11). Auch bei Untersuchung ausschließlich der Patienten mit rein deutscher Abstammung ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede für die MDR1-Polymorphismen und bezgl. der Pharmakoresistenz.

	MDR1				
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp	Gesamt (100%)	p-Wert*
Studiengruppe	50 (31,3%)	80 (50%)	30 (18,8%)	160	0,84
Kontrollgruppe	24 (33,8%)	32 (45,1%)	15 (21,1%)	71	0,48
Gesamt	74 (32%)	112 (48,5%)	45 (19,5%)	231	0,82

Tabelle 11: Aufteilung der C3435T-Polymorphismen des MDR1 auf die Studien- und Kontrollgruppe (*= nach Hardy-Weinberg-Gleichung). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Im Hinblick auf die weiteren demographischen Daten der verschiedenen Untergruppen des MDR1-Polymorphismus ergab sich folgendes Bild:
In der TT-Gruppe waren 59,5% männlich, in der CC-Gruppe 51,1% (s. Tabelle 12).

Geschlecht	MDR1				
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp	Gesamt (100%)	p-Wert*
männlich	44 (33,8%)	63 (48,5%)	23 (17,7%)	130	0,96
weiblich	30 (29,7%)	49 (48,5%)	22 (21,8%)	101	0,81
Gesamt	74 (32%)	112 (48,5%)	45 (19,5%)	231	0,82

Tabelle 12: Aufteilung der Geschlechter auf die verschiedenen C3435T-Polymorphismen des MDR1 (*= nach Hardy-Weinberg-Gleichung). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Das mittlere Alter betrug in der TT-Gruppe 11 Jahre und 7 Monate, in der CC-Gruppe 11 Jahre und 4 Monate. 86,5% waren in der TT-Gruppe Kaukasier, in der CC-Gruppe waren es 91,1% (s. Tabelle 13).

Ethnizität	MDR1				
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp	Gesamt (100%)	p-Wert*
Kaukasier	64 (32,3%)	93 (47%)	41 (20,7%)	198	0,50
Asiat	0	2 (100%)	0	2	0,16
Araber	4 (33,3%)	5 (41,7%)	3 (25%)	12	0,58
Slawen	2 (22,2%)	7 (77,8%)	0	9	0,06
Gemischter Herkunft	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	10	0,75
Gesamt	74 (32%)	112 (48,5%)	45 (19,5%)	231	0,82

Tabelle 13: Ethnizität in den verschiedenen C3435T Polymorphismen des MDR1 (*= nach Hardy-Weinberg-Gleichung). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Das Auftreten von Erbkrankheiten in der näheren Verwandtschaft zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (TT: 55,4% vs. CC: 62,2%).

Was die Risikofaktoren für eine Epilepsie betrifft, bestand ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Auftretens eines Fieberkrampfes in der Vorgeschichte (TT: 13,5% vs. CC: 20,0%). Dafür war aber das Auftreten einer Epilepsie in der Familie statistisch signifikant häufiger in der CC-Untergruppe (TT:

60,3% vs. CC: 82,2%; $p = 0,0153$; Odds ratio: 0,3355; 95% Confidence Interval: 0,1370 – 0,8217). Die Zeit von der Erstmanifestation eines epileptischen Anfalles bis zur endgültigen Diagnosestellung betrug in der Gruppe der pharmakoresistenten Epilepsiepatienten im Schnitt 9 Wochen, in der Kontrollgruppe im Durchschnitt 21 Wochen. Dies mag in den unterschiedlichen Epilepsiesyndromen begründet sein, da sich z.B. idiopathische, epilepsietypische Potentiale besser im Schlaf-EEG nachweisen lassen, welches vielleicht nicht sofort durchgeführt wurde. Oder es wurde im Rahmen der Grunderkrankung frühzeitig eine Bildgebung durchgeführt mit der Diagnosestellung einer symptomatisch fokalen Epilepsie und früherem Behandlungsbeginn.

Die Epilepsiesyndrome verteilten sich in den beiden Untergruppen hinsichtlich der Rangfolge identisch. Die häufigste Epilepsieform war in beiden Gruppen die symptomatisch fokale Epilepsie (TT: 55,4% vs. CC: 60%), gefolgt von einer nicht näher klassifizierten Epilepsie (TT: 21,6% vs. CC: 20,0%) und der idiopathisch fokalen Epilepsie (TT: 12,2% vs. 8,9%) (s. Tabelle 14).

Hinsichtlich der Nebendiagnosen fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Polymorphismen und der Art der Nebendiagnose.

Epilepsiediagnose	MDR1				
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp	Gesamt (100%)	p-Wert*
Symptomatisch fokale Epilepsie	41 (32%)	60 (46,9%)	27 (21,1%)	128	0,56
Idiopathisch fokale Epilepsie	9 (45%)	7 (35%)	4 (20%)	20	0,26
Symptomatisch generalisierte Epilepsie	0	0	1	1	n.b.
Idiopathisch generalisierte Epilepsie	6 (21,4%)	20 (71,4%)	2 (7,1%)	28	0,71
pathologisches EEG	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)	10	0,53
nicht näher klassifizierte Epilepsie	16 (36,4%)	19 (43,2%)	9 (20,5%)	44	0,45
Gesamt	74 (32%)	112 (48,5%)	45 (19,5%)	231	0,82

Tabelle 14: Aufteilung der Epilepsiesyndrome auf die verschiedenen C3435T Polymorphismen des MDR1 (n.b.= nicht berechenbar; *= nach Hardy-Weinberg-Gleichung). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte.

Im Mittel wurden sowohl die Patienten mit dem TT-Polymorphismus wie auch die Patienten mit dem CC-Polymorphismus jeweils mit 5 AED behandelt. Bezüglich der Frage einer Abweichung in der Toleranzentwicklung auf AED in den verschiedenen MDR1 Polymorphismen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der TT-Untergruppe und der CC-Untergruppe (TT: 24,3% vs. CC: 17,8%). Ebenso war in beiden Polymorphismen eine Veränderung der Anfallssituation unter Fieber oder Antibiotikabehandlung statistisch unbedeutend.

Für die Behandlung mit AED konnten 506 Therapieangaben ausgewertet werden. Betrachtet man die Wirksamkeit der AED in Abhängigkeit vom C3435T-MDR1 Polymorphismus, so ergibt sich folgendes Bild (s. Tabelle 15).

Der TT-Polymorphismus zeigte statistisch signifikant eine häufigere Anfallsfreiheit als der CC-Polymorphismus ($p=0,0104$; Odds Ratio: 2,718; 95% CI: 1,248 – 5,920).

Dafür zeigte der CC-Polymorphismus eine nicht ganz signifikant häufigere 25% Anfallsreduktion ($p=0,0519$; Odds Ratio: 0,3307; 95% CI: 0,1078 – 1,015) und eine signifikant häufigere 50% Anfallsreduktion ($p=0,0033$; Odds Ratio: 0,2774; 95% CI: 0,1197 – 0,6429) sowie 75% Anfallsreduktion ($p=0,0081$; Odds Ratio: 0,05467; 95%

CI: 0,02995 – 1,001). Kein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich bei der Angabe der Wirkungslosigkeit für die AED (CC: 23,6% vs. TT: 27%). Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur blieben nur die Ergebnisse für die 50% Anfallsreduktion in der CC-Gruppe signifikant. Zu beachten ist der statistisch signifikante Unterschied, auch nach Bonferroni-Korrektur, bei den fehlenden Angaben in der TT-Gruppe der daher die Wirksamkeitsangaben der Patienten nur bedingt auswertbar macht ($p=0,0014$; Odds Ratio: 2,373; 95% CI: 1,417 – 3,974).

Wirksamkeit Medikation	MDR1			Gesamt (100 %)	p-Wert*
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp		
Wirkungslosigkeit	40 (27%)	73 (49,3%)	35 (23,6%)	148	0,13
25% Anfallsreduktion	5 (20%)	11 (44%)	9 (36%)	25	0,052
50% Anfallsreduktion	9 (21,4%)	15 (35,7%)	18 (42,9%)	42	0,0033
75% Anfallsreduktion	0	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8	0,0081
Anfallsfreiheit	34 (45,9%)	31 (41,9%)	9 (12,2%)	74	0,01
50% EEG- Verbesserung	0	0	1 (100%)	1	0,39.
100% EEG Sanierung	3 (60%)	0	2 (40%)	5	1,0
keine Angaben	82 (40,4%)	91 (44,8%)	30 (14,8%)	203	0,0014
Gesamt	173 (34,2%)	224 (44,3%)	109 (21,5%)	506	

Tabelle 15: Wirksamkeit der AED in den verschiedenen C3435T Polymorphismen des MDR1 (* = nach Hardy-Weinberg-Gleichung und InStat). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte. Es zeigte sich nach Bonferroni-Korrektur ein statistisch signifikanter Unterschied für das Merkmal der 50%-Anfallsreduktion in der CC-Gruppe und für die fehlenden Therapieangaben in der TT-Gruppe.

Hinsichtlich des Auftretens von Nebenwirkungen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe CC-Polymorphismus vs. TT-Polymorphismus (99,1% vs. 98,3%).

Die einzelnen Nebenwirkungen wiesen in den verschiedenen MDR1-Polymorphismen folgende Verteilung auf (s. Tabelle 16). Hinsichtlich der Nebenwirkungen des ZNS unterschieden sich der TT- und der CC-Polymorphismus

nicht von einander. Unterschied man weitere Subgruppen, so zeigte sich ein nicht ganz statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Polymorphismen im Hinblick auf die Anfallsverschlechterung auf. Diese war häufiger in der TT-Gruppe ($p = 0,09$; Odds Ratio = 2,318; 95% CI: 0,8853 – 6,6068), war aber nach Bonferroni-Korrektur auch nicht mehr statistisch signifikant.

Nebenwirkungen	MDR-Typ				
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp	Gesamt (100 %)	p-Wert *
ZNS-NW	109 (37,7%)	122 (42,2%)	58 (20,1%)	289	0,16
• Müdigkeit	29 (38,2%)	35 (46,1%)	12 (15,8%)	76	0,51
• Anfallsverschlechterung	23 (46%)	21 (42%)	6 (12%)	50	0,09
• EEG-Verschlechterung	3 (50%)	3 (50%)	0	6	0,55
Gastrointestinale NW	19 (27,9%)	35 (51,5%)	14 (20,6%)	68	0,74
Allergische Reaktionen	11 (31,4%)	12 (34,3%)	12 (34,3%)	35	0,18
Blutwerte (Elektrolyte, Gerinnung)	14 (31,8%)	24 (54,5 %)	6 (13,6%)	44	0,48
Gingivahyperplasie	4 (57,1)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	7	1,0
Hirsutismus	3 (75%)	0	1 (25%)	4	1,0
Gewichtszunahme/Adipositas	8 (21,6%)	19 (51,4%)	10 (27%)	37	0,14
EKG-Veränderungen, Kardiomyopathie	0	1 (50%)	1 (50%)	2	0,38
Gesamt	168 (34,6%)	214 (44%)	104 (21,4%)	486	

Tabelle 16: Aufteilung der verschiedenen Nebenwirkungsarten auf den C3435T Polymorphismus des MDR1 (*= nach Hardy-Weinberg-Gleichung und InStat). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte. Es zeigte sich nach Bonferroni-Korrektur kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Untergruppen.

Statistisch höchst signifikant wurden in der TT-Gruppe die AED häufiger wegen zu geringer Reduktion der Anfallsfrequenz abgesetzt (=Anfallspersistenz) ($p < 0,0001$; Odds Ratio = 3,912; 95% CI: 1,886 – 8,116). Ein signifikanter Unterschied ergab sich noch für den zweithäufigsten Absetzungsgrund in der TT-Gruppe, dem Wirkverlust ($p = 0,0436$; Odds Ratio = 2,632; 95% CI: 1,035 – 6,692). In der CC-Gruppe wurde im Vergleich zu der TT-Gruppe extrem signifikant häufiger das AED wegen Nebenwirkungen abgesetzt ($p < 0,0001$; Odds Ratio 0,3459; 95% CI: 0,2107 – 0,5679), aber auch wegen Anfallsfreiheit ($p = 0,0004$; Odds Ratio: 0,03441; 95% CI: 0,001964 – 0,6029). Kein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich in der Angabe der Wirkungslosigkeit. (s. Tabelle 17). Aber auch hier ist der statistisch signifikante Unterschied bei den fehlenden Angaben in der TT-Gruppe zu beachten ($p = 0,0074$; Odds Ratio: 4,619; 95% CI: 1,338 – 15,942). Nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur blieben nur die Unterschiede für Anfallspersistenz, Anfallsfreiheit und Nebenwirkungen statistisch signifikant

Medikation Absetzungsgrund	MDR-Typ			Gesamt (100 %)	p-Wert *
	TT-Typ	CT-Typ	CC-Wildtyp		
Wirkungslosigkeit	19 (27,9%)	33 (48,5%)	16 (23,5%)	68	0,36
Anfallspersistenz	49 (43,4%)	54 (47,8%)	10 (8,8 %)	113	< 0,0001
Wirkverlust	23 (59%)	10 (25,6%)	6(15,4%)	39	0,04
Anfallsfreiheit	0	4 (33,3%)	8 (66,7%)	12	0,0004
Status epilepticus	2 (16,7%)	10 (83,3%)	0	12	0,52
Nebenwirkungen	60 (27,5%)	92 (42,2%)	66 (30,3%)	218	< 0,0001
Therapieänderung	0	1 (100%)	0	1	0,32
Op-Vorbereitung	0	3 (100%)	0	3	0,08
postoperativ	0	1 (100%)	0	1	0,32
Keine Angaben	20 (51,3%)	16 (41%)	3 (7,7%)	39	0,0074
Gesamt	173 (34,2%)	224 (44,3%)	109 (21,5%)	506	

Tabelle 17: Absetzungsgründe in den verschiedenen C3435T Polymorphismen des MDR1. (*= nach Hardy-Weinberg-Gleichung und InStat). Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Gesamtanzahl in der vorletzten Spalte. Es zeigt sich nach Bonferroni-Korrektur ein statistisch signifikanter Unterschied für die Absetzungsgründe Anfallspersistenz, Anfallsfreiheit und dem generellen Auftreten von Nebenwirkungen.

	CC-Typ	TT-Typ	p-Wert*
Therapieresistente	66,7%	67,6%	n.s.
Kontrollen	33,3%	32,4%	n.s.
Geschlecht	51,1% männlich	59,5% männlich	n.s.
Alter	11 J. 4 Mo.	11 J. 7 Mo.	
Häufigstes Epilepsiesyndrom	Symptomatisch fokale Epilepsie (60,0%)	Symptomatisch fokale Epilepsie (55,4%)	n.s.
Wirksamkeit AED	<ul style="list-style-type: none"> Anfallsfreiheit (8,3%) Wirkungslosigkeit (32,1%) 	<ul style="list-style-type: none"> Anfallsfreiheit (19,7%) Wirkungslosigkeit (23,1%) 	<ul style="list-style-type: none"> 0,01 n.s.
Mittlere Anzahl von AED	5	5	
Häufigster Absetzungsgrund für AED	<ul style="list-style-type: none"> NW (61%) Anfallspersistenz (9,2%) Wirkverlust (5,5%) 	<ul style="list-style-type: none"> NW (34,7%) Anfallspersistenz (28,3%) Wirkverlust (13,3%) 	<ul style="list-style-type: none"> 0,0001 0,0001 0,04
Auftreten von Nebenwirkungen	99,1%	98,3%	n.s.
Toleranzentwicklung	17,8%	24,3%	n.s.

Tabelle 18: Vergleich zwischen der CC- und der TT-Untergruppe des C3435T-Polymorphismus des MDR1. (Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf das Auftreten innerhalb der TT- bzw. CC-Gruppe. /* = berechnet mittels Fisher-Exact-Test). Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied in dem Auftreten von Anfallsfreiheit bei der Wirksamkeit der AED, sowie der Angabe von Anfallspersistenz, Wirkverlust und Auftreten von Nebenwirkungen als Absetzungsgrund. Nach Bonferroni-Korrektur ist der Absetzungsgrund Wirkverlust sowie die Anfallsfreiheit bei der Wirksamkeitsangabe nicht mehr statistisch signifikant.

3.3. Subgruppenanalyse der MDR1 spezifischen AED

Zusätzlich wurden die AED näher analysiert, die als Substrat von MDR1 transportiert werden (CBZ, OXC, LTG, PB, PHT, TPM) hinsichtlich einer möglichen Assoziation zwischen dem MDR1-Polymorphismus und dem Auftreten von Nebenwirkungen (NW). VPA wurde als wahrscheinliches Substrat von MDR1, untersucht. Hierzu wurden die NW in Untergruppen zusammengefasst. Die einzelnen Nebenwirkungsgruppen waren allergische Reaktionen, gastrointestinale Reaktionen und Störung des ZNS. Getrennt untersucht wurden ZNS-NW Müdigkeit und Anfallsverschlechterung (s. Tabelle 22 im Anhang).

Lediglich für das AED CBZ ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Auftreten von Müdigkeit bzw. tendenziell statistisch signifikant für gastrointestinales NW. Müdigkeit war statistisch signifikant häufiger in der TT-Gruppe ($p=0,035$; Odds Ratio =12,25; CI: 1,27 – 118,43). Die gastrointestinalen NW traten dem gegenüber lediglich in der CC-Gruppe auf ($p=0,0824$; Odds Ratio 0,064; CI: 0,0028 – 1,436). Diese Ergebnisse blieben nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant.

3.4. Haplotypenanalyse

Zur Untersuchung einer möglichen Assoziation der Pharmakoresistenz mit weiteren Polymorphismen auf dem MDR1 Gen wurden zusätzlich noch die Polymorphismen der Exon 12 und 21 bestimmt, die mit dem Exon 26 C3435T in *linkage disequilibrium* stehen. Dies gelang bis auf 17 Patienten für den C1236T Polymorphismus und bis auf 12 für den G2677T/A Polymorphismus (s. **Tabelle 19**).

Mittels dieser Ergebnisse wurden die einzelnen Haplotypen und Haplotypenkombinationen bestimmt. In unserem Kollektiv zeigte sich, dass die drei am häufigsten vorkommenden Haplotypen TTT, CGC und CGT waren. Die restlichen möglichen Haplotypen kamen unter 3 % (s. Tabelle 20) bzw. gar nicht vor. Dabei war kein statistisch signifikanter Unterschied im Auftreten von TTT, CGC und CGT in den beiden Gruppen zu beobachten (berechnet mittels χ^2 -Test; bei kleiner Fallzahl mittels Fisher's Exact Test).

Hinsichtlich der möglichen Haplotypenkombinationen auf beiden Allelen waren in absteigender Häufigkeit CGC/TTT, CGT/TTT, TTT/TTT; CGC/CGC und CGC/CGT die häufigsten Vertreter. Auch hier bestand ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen (s. Tabelle 21).

	Pharmakoresistente Epilepsien		Kontrollen		Signifikanz
	N = Fallzahl	%	N = Fallzahl	%	p =
Genotypen					
Exon 12 C1236T					
CC	41	25,6%	22	31%	0,30*
CT	73	45,6%	26	36,6%	0,45*
TT	29	18,1%	11	15,5%	0,85**
k. Daten	17	10,6%	12	16,9%	
Exon 21 G2677A/T					
GG	45	28,1%	22	31%	0,42**
GT	71	44,4%	28	39,4%	0,90*
TT	29	18,1%	9	12,7%	0,55**
GA	3	1,9%	2	2,8%	0,63**
AT	0	0	0	0	n.b.
AA	0	0	0	0	n.b.
k. Daten	12	7,5%	10	14,1%	
Exon 26 C3435T					
CC	30	18,8%	15	21,1%	0,72**
CT	80	50%	32	45,1%	0,58*
TT	50	31,3%	24	33,8%	0,82*

Tabelle 19: Genotypenfrequenz von MDR1-Polymorphismen an Exons 12, 21 und 26
 Berechnung der Signifikanz mittels χ^2 (*) und Fisher's – Exact -Test bei unter 5 Patienten in einer Gruppe(**); n.b. = nicht berechnet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der Patienten in der Studien- (160) bzw. in der Kontrollgruppe (71).

	Pharmakoresistente Epilepsien		Kontrollen		Signifikanz
	N = Fallzahl	%	N = Fallzahl	%	p =
Haplotypen (Exon 12 – 21 – 26)					
TTT	111	34,7%	40	28,2%	0,45*
CGC	102	31,9%	47	33,1%	0,45*
CGT	41	12,8%	19	13,4%	0,64**
TTC	9	2,8%	4	2,8%	1,0**
TGT	6	1,9%	1	0,7%	0,68**
CTT	5	1,6%	1	0,7%	0,68**
TGC	4	1,3%	2	1,4%	1,0**
CTC	3	0,9%	0	0	0,56**
CAC	2	0,6%	1	0,7%	1,0**
CAT	1	0,3%	1	0,7%	0,5**
k. Daten	36	11,3%	26	18,3%	
Total	320	(100%)	142	(100%)	alle Werte n.s.

Tabelle 20: Haplotypenfrequenz der Exon 12, 21 und 26 des MDR1 (Signifikanzen mittels χ^2 (*) und Fisher's – Exact - Test (**) berechnet; n.s. = nicht statistisch signifikant)

	Pharmakoresistente Epilepsien		Kontrollen		Signifikanz
	N = Fallzahl	%	N = Fallzahl	%	p =
Haplotypenkombinationen (Exon 12 – 21 – 26)					
CGC/TTT	37	23,1%	16	22,5%	0,86**
CGT/TTT	22	13,8%	6	8,5%	0,38**
TTT/TTT	21	13,1%	7	9,9%	0,82**
CGC/CGC	18	11,3%	10	14,1%	0,50**
CGC/CGT	11	6,9%	7	9,9%	0,41**
CGC/CTT	5	3,1%	0	0	0,32**
TTC/TTT	5	3,1%	0	0	0,32**
CGC/TGT	4	2,5%	0	0	0,32**
CGC/TTC	4	2,5%	2	2,8%	1,0**
CGT/CGT	4	2,5%	3	4,2%	0,42**
CTC/TTT	3	1,9%	0	0	0,56**
CGC/CAC	2	1,3%	1	1,4%	1,0**
CGC/TGC	2	1,3%	0	0	1,0**
TGT/TTT	1	0,6%	1	1,4%	0,50**
TGC/TTT	1	0,6%	2	2,8%	0,20**
TGC/TGT	1	0,6%	0	0	1,0**
CGC/CAT	1	0,6%	0	0	1,0**
TTC/TTC	0	0	1	1,4%	0,29**
CGT/CAT	0	0	1	1,4%	0,29**
CTT/TTT	0	0	1	1,4%	0,29**
k. Daten	18	11,3%	13	18,3%	
Total	160	(100%)	71	(100%)	alle Werte n.s.

Tabelle 21: Frequenz der Haplotypenkombinationen der Exons 12, 21 und 26 des MDR1
(Berechnung der Signifikanz mittels Fisher's – Exact -Test (**); n.s.= nicht statistisch
signifikant)

V. Diskussion

1976 wurde das Multidrugresistenzprotein MDR1 (P-Glycoprotein; Pgp) entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass es an der Blut-Darm- und Blut-Hirn-Schranke (BHS) lokalisiert ist und als Efflux-Pumpe den Körper vor Schadstoffen schützt. Es wird vermutet, dass eine pathologische Überexpression von Pgp mit zu dem Phänomen der Pharmakoresistenz beiträgt, wie es bei Patienten mit Krebserkrankungen (61), Rheumatoider Arthritis (109) oder chronischen Darmerkrankungen (51) beobachtet werden konnte. Seine Lokalisation an der BHS und die mögliche Rolle in der Pharmakoresistenz machen MDR1 auch für die Epilepsieforschung interessant. An Hirnresektaten von Epilepsiepatienten oder Tiermodellen für die Temporallappenepilepsie (TLE) wurde eine Überexpression von MDR1 im epileptogenen Fokus beschrieben ((8); (13), (42), (175), (191), (199)). Einige der gängigsten Antikonvulsiva (AED) wie Phenytoin (PHT), Carbamazepin (CBZ), Phenobarbital (PB) oder Lamotrigin (LTG) sind Substrate für MDR1 ((110), (134), (168)). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Überexpression von Pgp die AED daran hindert, an ihren Wirkungsort zu gelangen und somit Pgp eine Rolle in der pharmakoresistenten Epilepsie spielt.

Die Expression eines Gens und seine Funktionalität werden u. a. auch von Polymorphismen im Gen beeinflusst. Im Exon 26 des MDR1-Gens führt die C->T Transversion bei Position 3435 zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz und ist damit eine stille oder auch synonyme Mutation. Dennoch wurden Genotyp-Phänotyp-Assoziationen zwischen den C3435T-Polymorphismen und der Funktionalität des P-Glycoproteins beobachtet. Man konnte bei Personen mit dem TT-Genotyp weniger P-Glykoprotein im Intestinum feststellen (70) und die mRNA-Expression in Leukozyten war am niedrigsten in der TT-Gruppe (164). Auch bei HIV1- infizierten Patienten war der TT-Genotyp mit einer niedrigeren MDR1-Expression assoziiert (52). Die Leukozyten von Patienten mit dem CC-Polymorphismus enthielten weniger MDR1 Substrat Rhodamin als die der TT-Gruppe. Dies legt damit die Annahme eines vermehrten Efflux durch MDR1 nahe (68). Es gibt aber auch gegensätzliche Beobachtungen. So beschrieben Kim et al. bei Amerikanern einen höheren MDR1 Spiegel in der TT-Gruppe und einen damit assoziierten niedrigeren Plasmaspiegel von Fexofenadine (ebenfalls ein MDR1

Substrat) (91). Sakaeda et al. fanden übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kim und Kollegen ebenfalls eine erniedrigte *Area under the curve* von Digoxin (ein weiteres Pgp Substrat) bei Personen mit dem TT3435-Genotyp (146). Allerdings sind Fexofenadine und Digoxin auch Substrate für mehrere Mitglieder der Organische Anionentransporter (OATP), was sich auch auf die Beurteilung der Pgp-Transportfunktion für Fexofenadine und Digoxin auswirken könnte ((44), (78)). Nakamura et al. fanden eine erhöhte MDR1 Expression im Duodenum von Personen des TT-Typs (123).

In diesem Kontext untersuchten Siddiqui et al. 2003 den C3435T- Polymorphismus bei Epilepsiepatienten. Sie fanden eine signifikante Assoziation zwischen dem CC-Typ und einer pharmakoresistenten Epilepsie. Tan et al. und Sills et al. gelang eine Wiederholung dieser Ergebnisse trotz größerer Fallzahlen (609 bzw. 400 Epilepsiepatienten) bei gleichem Studiendesign nicht ((165), (169), (188)). Wohingegen Kwan und Kollegen bei 746 Han Chinesen mit Epilepsie eine Assoziation zwischen dem Therapieansprechen und dem MDR1 TT-Genotyp zeigen konnten (98). Die Gruppe um Zimprich untersuchte die Haplotypen der Exons 12, 21 und 26 des MDR1 Gens bei Patienten mit TLE. Die Patienten wurden in drei Pharmakoresistenzstufen eingeteilt und die therapieresistenteste Gruppe zeigte sich signifikant häufiger homozygot für den CGC-Haplotypen. Dies war noch auffälliger in der Untergruppe der mesialen Temporallappenepilepsie (MTLE) (209).

Möglicherweise ist das Nichtreplizieren der genetischen Assoziationsstudien auch zurückzuführen auf das komplexe Haplotypensystem und ihnen zugrunde liegend das *linkage disequilibrium*. Der stille SNP C3435T steht in *linkage disequilibrium* mit G2667T/A, einer Missense Mutation (81). Hung und Kollegen fanden heraus, dass die drei SNPs C1236T, G2667T/A und C3435T einen Einfluss auf das therapeutische Ansprechen der Epilepsie hatten. Die Haplotypen CGC, TGC und TTT waren bei Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie signifikant häufiger nachweisbar (76).

In Anlehnung an die Studie von Siddiqui und Kerb untersuchten wir 231 Epilepsiepatienten des Behandlungszentrums Vogtareuth auf den C3435T Polymorphismus des MDR1-Gens. Es sollte dabei überprüft werden, ob eine

mögliche Korrelation zwischen dem Genotypen des Patienten und den Nebenwirkungen, der Wirkung und dem Outcome der Therapie besteht.

Vorausschickend ist folgendes zu erwähnen. Die aus 160 Studienpatienten und 71 Kontrollpatienten bestehende Kohorte unterschied sich in zwei folgenden Merkmalen voneinander. Das Auftreten einer Epilepsie in der nächsten Familie war statistisch häufiger in der CC-Untergruppe ($p = 0,015$). Zusätzlich war die idiopathisch generalisierte Epilepsie signifikant häufiger in der TT-Gruppe ($P = 0,02$), bei allerdings sehr kleiner Fallzahl.

Bei unseren Patienten zeigte sich in Bezug auf **Art und Anzahl der Nebenwirkungen** kein statistisch signifikanter Unterschied in der CC- und in der TT-Gruppe. Jedoch wurde AED statistisch signifikant häufiger in der CC-Gruppe wegen aufgetretener Nebenwirkungen abgesetzt ($p < 0,0001$; Odds Ratio 0,3459; 95% CI: 0,2107 – 0,5679). Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen, dass der CC-Polymorphismus im Bereich des epileptischen Gewebes verstärkt exprimiert ist und dort einen therapeutischen Spiegel des AED verhindert, im übrigen Gehirn jedoch normal exprimiert ist und so die AED-Spiegel die NW-Grenze erreichen könnten (174).

Bezüglich der **Nebenwirkungen** untersuchten wir speziell noch einmal die AED, die bislang in Experimenten als Substrate (CBZ, Oxcarbazepin (OXC), LTG, PB, PHT, Topiramate (TPM)) oder wahrscheinliche Substrate (Valproinsäure (VPA)) für MDR1 nachgewiesen worden waren. Die Nebenwirkungen wurden in einzelne Untergruppen, wie allergische Reaktionen, gastrointestinale NW etc. zusammengefasst und dem MDR1-Polymorphismus gegenüber gestellt. Hierbei zeigte sich lediglich für das AED CBZ ein statistisch signifikanter Unterschied für das Auftreten von NW in den beiden SNP des MDR1.

Bei CBZ war der TT-Typ statistisch signifikant häufiger mit dem Auftreten von Müdigkeit assoziiert ($P = 0,035$; Odds Ratio = 12,25; CI: 1,27 – 118,43). Der CC-Typ zeigte eine leichte Assoziation für gastrointestinale NW ($P = 0,0824$; Odds Ratio 0,064; CI: 0,0028 – 1,436). Dies würde sich daher erklären lassen, dass sich bei dem TT-Typ durch den geringeren Efflux des CBZ ein höherer CBZ-Spiegel im Gehirn

findet und zu Müdigkeit führt. Demgegenüber schleust der aktivere CC-Typ an der Blut-Darm-Schranke mehr CBZ zurück in den Darm und führt so zu dem vermehrten Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen. Nach Bonferroni-Korrektur waren die Ergebnisse jedoch nicht mehr statistisch signifikant.

Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Behandlung von Epilepsiepatienten, im Besonderen solche mit einer therapierefraktären Epilepsie, sehr komplex ist und dabei meist Kombinationen von Medikamenten gegeben werden, die sich auch gegenseitig wieder beeinflussen können. Zusätzlich gibt es auch Hinweise in der Literatur, dass einige AED einen hemmenden oder einen stimulierenden Einfluss auf Pgp haben können ((16), (204)). Weiss und Kollegen konnten zeigen, dass CBZ einen hemmenden Einfluss auf Pgp hat. Die hemmende Potenz von CBZ war jedoch wesentlich geringer als die des bekannten Pgp Inhibitors Verapamil. Die Antiepileptika PHT, LTG und VPA zeigten ebenfalls Hemmung von Pgp in Bereichen, die oberhalb des therapeutischen Spiegels lagen (204). Mögliche hemmende Einflüsse der AED auf die Pgp-Wirkung konnte jedoch in unserer retrospektiven Studie nicht berücksichtigt werden. Hierzu wären prospektive Multicenterstudien mit therapieresistenten Patienten mit einem AED nötig (16).

Die antikonvulsive **Therapie** war in der TT-Gruppe wirksamer. Hier zeigte sich statistisch signifikant häufiger eine Anfallsfreiheit ($p=0,0104$; Odds Ratio: 2,718; 95% CI: 1,248 – 5,920). Dies steht in Einklang mit der Hypothese, dass der CC-Typ die aktivere Form des C3435T-Polymorphismuses ist, die die AED vermehrt über die BHS wieder ins Blut zurücktransportiert. Damit stehen keine therapeutischen Spiegel am Ort des epileptischen Geschehens zur Verfügung. Beim TT-Typ steht demzufolge eine höhere Konzentration der AED an ihrem Wirkort zur Verfügung, die - wie in unserer Studienpopulation beobachtet - zu einer besseren Anfallskontrolle führen. Mit unserer Hypothese der aktiveren CC-Form des C3435T Polymorphismus des MDR1 lässt sich leider nicht die Angabe der Patienten erklären, die statistisch signifikant häufiger eine 50% Anfallsreduktion ($p=0,0030$; Odds Ratio: 0,2774; 95% CI: 0,1197 – 0,6429) wie auch eine 75% Anfallsreduktion ($p=0,0081$; Odds Ratio: 0,05467; 95% CI: 0,02995 – 1,001) bei CC-Phänotyp angaben. Nicht ganz signifikant war die 25% Anfallsreduktion in der CC-Genotyp-Gruppe ($p=0,0519$; Odds Ratio: 0,3307; 95% CI: 0,1078 – 1,015). Einschränkend ist aber zu bemerken, dass ein

statistisch signifikante Unterschied hinsichtlich der fehlenden Angaben zur Wirksamkeit der AED in der TT-Gruppe bestand ($p=0,0014$; Odds Ratio: 2,373; 95% CI: 1,417 – 3,974). Nach Bonferroni-Korrektur blieben nur die 50% Anfallsreduktion in der CC-Gruppe und die fehlenden Therapieangaben in der TT-Untergruppe statistisch signifikant, so dass gerade durch die fehlenden Angaben in der TT-Untergruppe die Ergebnisse nur eingeschränkt zu bewerten sind.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse – einmal zeigt der TT-Typ eine Assoziation mit Wirkverlust bzw. Anfallspersistenz auf der anderen Seite ist er assoziiert mit Anfallsfreiheit - könnten auch auf der Tatsache beruhen, dass die Nebenwirkungen durch die Patienten angegeben wurden, der Therapieeffekt aber zusätzlich durch die behandelnden Ärzte beurteilt wurde und dass es sich bei unserer GEPAED-Studie um eine retrospektive Untersuchung handelte. Aber auch bei den Angaben zum Absetzungsgrund bestand in der Sparte der fehlenden Angaben in der TT-Gruppe ein nicht ganz statistisch signifikanter Unterschied, der die Wertung dieser Angaben nur eingeschränkt zulässt.

Hinsichtlich einer möglichen **Toleranzentwicklung** zeigte sich ein statistisch sehr signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie und der Kontrollgruppe (PR.: 27,5% vs. KO.: 8,5%; $p=0,0009$; Odds Ratio: 4,109; 95% CI: 1,661 – 10,164). Kein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich zwischen den beiden homozygoten Polymorphismen (TT 24,3% vs. CC 17,8%).

Unsere **pharmakoresistenten Epilepsiepatienten** wiesen ähnlich häufig TT- und CC-Polymorphismus (67,6% vs. 66,7%) auf. Auch bei Beschränkung der Auswertung auf Patienten mit rein deutscher Abstammung ergab sich keine Assoziation der Pharmakoresistenz mit einem MDR1-Polymorphismus. Unsere Ergebnisse sind damit im Einklang mit den Ergebnissen von Tan et al., Sills et al., Kim et al und Shawan et al. ((92), (163); (169), (188)). Wie auch diese Gruppen konnten wir die Ergebnisse von Siddiqui et al. nicht wiederholen (165).

Zur Überprüfung, ob durch Bestimmung der **Haplotypenkombinationen** eine bessere Aussage hinsichtlich einer pharmakoresistenten Epilepsie möglich wäre,

führten wir in Anlehnung an Hung und Kollegen die Bestimmung der Polymorphismen der Exone 12 und 21 zusätzlich zu Exon 26 des MDR1 durch (76). In unserer Studienpopulation bestand, wie bereits für den C3435T-Polymorphismus untersucht, auch für die beiden anderen Polymorphismen C1236T und G2677T/A kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Auftretens in den beiden Gruppen. Die am häufigsten zu beobachteten Haplotypen waren TTT, CGC, CGT und TTC. In der Arbeit von Hung und Kollegen waren dies TTT, CGC wie bei uns und zusätzlich TGC gewesen. Zimprich und Mitarbeiter fanden in ihrem Studienkollektiv am häufigsten die auch bei uns beobachteten Haplotypen CGC, CGT und TTT. Wir konnten jedoch keine Assoziation unserer Haplotypen mit dem Auftreten einer Pharmakoresistenz feststellen, wie dies von Hung und Zimprich berichtet worden war ((76), (209)). Auch hinsichtlich der am häufigsten festgestellten Haplotypenkombinationen CGC/TTT, CGT/TTT, TTT/TTT, CGC/CGC und CGC/CGT fand sich kein feststellbarer statistisch signifikanter Unterschied. In der Arbeit von Zimprich zeigte sich zunächst ebenfalls eine ausgeglichene Verteilung der Haplotypen zwischen den Patienten mit einer Temporallappenepilepsie und den Kontrollen. Eine weitere Aufteilung der pharmakoresistenten Epilepsiepatienten in drei Untergruppen, abhängig vom Ansprechen auf die Therapie, ergab dann eine Assoziation der Haplotypenkombination CGC/CGC mit einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie. Die Autoren folgerten daher, dass der Grad der Pharmakoresistenz durch das MDR1-Gen moduliert werden könnte (209). Dieses konnten wir in unserer pharmakoresistenten Gruppe nicht weiter nachvollziehen, da diese aus heterogenen Epilepsiesyndromen bestand und nicht nur, wie bei Zimprich, aus Temporallappenepilepsien. Darüber hinaus war der CGC/CGC Haplotyp in der Kontrollgruppe leicht häufiger vertreten als in der Studiengruppe.

Ho und Kollegen konnten eine Assoziation zwischen dem gängigsten Haplotypen und Colitis ulcerosa feststellen, nicht jedoch bei Morbus Crohn. Des Weiteren war diese Assoziation unabhängig von C3435T, sondern abhängig von SNP rs3789243 im Intron 3. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die verschiedenen Haplotypen teilweise als protektiver Faktor und teilweise als Risikofaktor gewertet werden konnten (69).

Bezüglich der Untersuchung von möglichen Assoziationen zwischen Therapieansprechen und Haplotypen des MDR1 dürften auch hier weitere Studien nötig sein unter Berücksichtigung des komplexen *linkage disequilibrium* Systems. Speziell der Befund, dass das 3' Ende von ABCB1 (MDR1) in hohem *linkage disequilibrium* zum 5' Beginn von ABCB4 (MDR3) steht, zeigt, dass MDR1 nicht isoliert betrachtet werden sollte (107).

Es gibt mehrere Ursachen, dass genetische Assoziationsstudien nicht repliziert werden können (43). Eine davon ist, dass die ersten positiven Assoziationsstudien zu einer Überschätzung der Effektgröße führen, so dass bei einer Wiederholung der Studie zur Überprüfung der Replikation größere Patientenzahlen notwendig sind. Dies war uns leider nicht möglich. Aber auch Tan et al., die die doppelte Patientenzahl untersuchten, fanden keine positive Assoziation in der Replikationsstudie. Sie hatten eine 90%-Power, um allelische Assoziationen mit einer Odds Ratio von 1.5 bzw. eine 80%-Power, um eine allelische Assoziation mit einer Odds Ratio von 1.4 zu erkennen (188).

Die Reproduzierbarkeit der Genotypisierung wurde überprüft, indem wir stichprobenartig einzelne Proben wiederholt bestimmten. Darüber hinaus erfolgte die Analyse geblendet gegenüber den klinischen Daten, wie in den Leitlinien empfohlen (108). Außerdem erfüllte auch unsere Studienpopulation die Hardy-Weinberg-Kriterien.

Verschiedene ethnische Hintergründe können genetische Studien sehr stark beeinflussen u. a. aufgrund eines verschiedenen *linkage disequilibriums*. Dies kann zu Problemen bei einer Replikation führen, da in verschiedenen Ethnizitäten unterschiedliche Assoziationen beobachtet werden können (43). Siddiqui führte seine Studie in England, Tan in Australien und Sills in Schottland durch. Selbst wenn – wie in unserer Studie der Fall – die Mehrheit der Studienpatienten Kaukasier waren und die Frequenz für das C-Allel bei den Kontrollpatienten in allen Studien sehr ähnlich war (Siddiqui: 43,0%; Tan: 45,4%; Sills: 42,9%; von Stülpnagel: 43,6%), so könnte dennoch ein Einfluss durch die unterschiedliche historische genetische Mischung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, wenn auch dieser relativ unwahrscheinlich sein dürfte. Zusätzlich sind die beobachteten genetischen

Assoziationen nicht konsistent in den verschiedenen ethnischen Gruppen. So haben Studien bei Kaukasiern eher eine Assoziation zwischen dem 3435TT-Genotyp und verminderter Pgp Aktivität bzw. Expression gezeigt, wohingegen die umgekehrte Assoziation bei Japanern beobachtet wurde ((44), (123), (146)).

Ein weiterer Grund, dass die genetische Assoziation, welche in der ersten Studie von Siddiqui beobachtet wurde, nicht erneut repliziert werden konnte, ist eine nur zufällig beobachtete Assoziation bei zu geringem Signifikanzniveau. Daher wurde auch von einigen Autoren ein Signifikanzniveau bis zu 1×10^{-8} gefordert, speziell dann, wenn in einem Datensatz mehrere Assoziationen überprüft werden ((21), (39), (43)).

Bei Gen-Assoziationstudien ist außerdem die Heterogenität, die durch die verschiedenen AED und deren unterschiedliche Anzahl mit daraus resultierenden zusätzlichen pharmakodynamischen Interaktionen zu bedenken, die eine wahre, aber schwache Assoziation z. B. zwischen C3435T und pharmakoresistenter Epilepsie maskiert (179).

Besteht eine Assoziation, ist diese jedoch mit einer noch niedrigeren Odds ratio $<1,4$ verknüpft. Damit wäre zur Überprüfung eine noch größere Studienpopulation als die von Tan mit 609 Patienten nötig.

Im Hinblick auf das komplexe Haplotypensystem sollte auch weiterhin eine mögliche Assoziation von SNPs immer auch mittels Haplotypenanalyse überprüft werden ((76), (207)).

Überträgt man die Genotypen-abhängige Expression von P-Glykoprotein auf die BHS und wird hier der Einfluss der Polymorphismen auf die Expression nicht bestätigt, so stellt dies die Rolle von P-Glykoprotein an der BHS in Frage (169). Dennoch wäre auch eine pathologische Überexpression von P-Glykoprotein nur in epileptogenen Foci möglich, unabhängig von genetischen Determinanten, z.B. aufgrund von persistierenden Anfällen. Dies wurde vermehrt in Tiermodellen für TLE beobachtet ((103), (144), (160), (200), (206)) oder durch die AED-Behandlung selbst, bislang aber im Tierexperiment nicht bewiesen (159). Auch die Ernährung oder Umweltfaktoren wie z.B. Orangensaft oder Naturstoffe wie Johanniskraut ((72), (45), (47), (64), (201)), können die P-Glykoproteinexpression beeinflussen. Zur Überprüfung wären hier weitere Studien an Patienten mit speziellen

Neuropathologien wie z.B. Hippokampussklerose, fokale kortikale Dysplasie (FCD), etc. erforderlich.

Die Rolle von P-Glykoprotein in der pharmakoresistenten Epilepsie muss noch weiter untersucht werden, da bislang ein *proof-of-principle* der Multidrugtransporter - Hypothese fehlt und noch einige Fragen offen sind. Nach Sisodiya (171) müssen für jeden postulierten Mechanismus der AED-Resistenz vier Kriterien erfüllt sein:

- erstens muss der Mechanismus in epileptischem Gewebe nachweisbar sein
- zweitens muss die Aufgabe des Mechanismus funktionell zu einer Pharmakoresistenz beitragen können
- des Weiteren muss der Mechanismus auch im lebenden Organismus nachweisbar sein
- zuletzt sollte durch Blockade des Mechanismus die Pharmakoresistenz zu überwinden sein.

Überprüft man nun das Vorliegen dieser vier Kriterien für MDR1, so ergibt sich Folgendes: MDR1 konnte in Resektaten von Epilepsiepatienten sowie in Tiermodellen z.B. für die TLE nachgewiesen werden ((13), (14), (42), (144), (160), (173), (174), (191), (198), (200)). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MDR1 bei Pharmakoresistenz durchaus eine Rolle spielt ((134), (136), (138), (144)) und auch in vivo wichtig ist (168). Dies konnte allerdings bislang nur anhand von Tierexperimenten und nicht am Menschen gezeigt werden. Ob die Hemmung des MDR1 zur Aufhebung der Pharmakoresistenz führt, wurde bislang nur in Fallberichten veröffentlicht ((77), (184)). Daher sind z.B. PET-Untersuchungen der P-Glykoproteinfunktion und MDR1 Inhibitoren beim Menschen wichtig (49). Dies konnten Sasongko et al. als erste an 12 freiwilligen Patienten studieren. Mittels PET untersuchten sie die Aktivität von Pgp an der menschlichen BHS. Als Pgp Substrat diente C¹¹ markiertes Verapamil und als Inhibitor Cyclosporin. Es zeigte sich eine milde Hemmung von Pgp mit einem Anstieg der intracerebralen Radioaktivität. Diese Methode der bildlichen Darstellung der Pgp-Aktivität könnte man auch verwenden, um den Einfluss der verschiedenen MDR1 Polymorphismen auf die Aktivität von Pgp zu untersuchen (150).

Bei all diesen positiven Forschungsergebnissen zu P-Glykoprotein und therapieresistenter Epilepsie gibt es jedoch auch Schwachstellen der MDR1-Transporter Hypothese.

Die molekularen Mechanismen der Überexpression sind bislang noch unklar. Es gibt experimentelle und klinische Hinweise, dass die Überexpression von MDR1 entweder intrinsisch (z.B. genetische Polymorphismen s. (148)) oder erworben (z.B. durch zahlreiche Anfälle s. (89)) sein könnte. Diese durch persistierende Anfälle induzierte lokale MDR1 Überexpression könnte ein Verteidigungsmechanismus der zweiten Reihe der BHS sein, da Anfälle zu einer vorübergehenden Öffnung und einer chronischen Dysregulation der BHS führen ((36), (37), (46)), wie es sich in abnormalen *tight junctions* oder einer Verdickung der Basalmembran widerspiegelt. Die dadurch leichter ins Gehirn eintretenden Stoffe müssen im Anschluss vermehrt wieder exportiert werden. Dies könnte in verstärktem Maße die MDR1 Transporter in Anspruch nehmen. Für den Grad der anfallsabhängigen Pgp-Überexpression könnten Polymorphismen in der Promotorregion mitverantwortlich sein. So zeigten Takane und Mitarbeiter, dass die Promotorhaplotypen, die T-1517aC, T-1017aC und T-129C enthielten, mit einem höheren Spiegel von transkriptioneller Aktivität und mRNA Expression assoziiert waren und dies unabhängig von C3435T (187).

Ein anderer möglicher Mechanismus für die Pgp Überexpression wäre eine Zellstressantwort ((160), (206)). Somit könnte die P-Glykoprotein-Überexpression ein Mechanismus sein, mittels dessen Anfälle weitere pharmakoresistente Anfälle induzieren, durch zu geringe AED-Konzentrationen am epileptogenen Fokus. Darüber hinaus würde dies auch erklären, weshalb eine hohe Anfallsfrequenz vor Therapiebeginn einen negativen Prognosefaktor darstellt (115). Ein weiteres Erklärungsmodell für die Pgp-Überexpression ist die Steuerung mittels Liganden-aktivierten Kernfaktorenrezeptoren (182). Bislang ist bekannt, dass diese Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der Regulation der Transkription von hepatischen medikamentenabbauenden Enzymen sowie hepatischen Medikamentenexportpumpen spielen. Bauer und Kollegen konnten zeigen, dass von diesen der Pregnane- X-Rezeptor bei Ratten (beim Menschen als Steroid und Xenobiotic-Rezeptor (SXR) bezeichnet) die Pgp Expression sowie die

Transportfunktion an der BHS erhöht ((17), (202)). Mögliche Substrate für diese Rezeptoren könnten AED darstellen.

Ein weiterer Schwachpunkt der MDR1 Hypothese ist, dass nicht alle AED Substrate für MDR1 sind. In Tierexperimenten wurden nur Transporteigenschaften für Felbamat (FBM), LTG, PB, PHT und TPM gezeigt ((136), (168)). Für CBZ gibt es widersprüchliche Ergebnisse. So konnten Potschka et al. und Rizzi et al. einen Transport von CBZ durch MDR1 in Tierexperimenten zeigen, während Owen et al. in ihren Experimenten keinen Transport nachweisen konnten ((127), (136), (144)). Ein anderes, neues AED, Levetiracetam (LEV), ist bislang das einzige AED, welches weder von MDR1 noch von MRP transportiert wird (132). Dennoch gibt es auch Epilepsiepatienten, die auf eine Behandlung mit LEV nicht ansprechen.

Daher dürften die Ursachen für eine pharmakoresistente Epilepsie in einer Kombination von vielen Faktoren liegen, die auch die Target- und die Multidrugtransporter-Hypothese beinhalten. Daneben gibt es noch weitere Transportproteine, wie die Multidrug Resistance Proteine (MRPs) (MRP1 mit MDR1 an der BHS (89), ebenso MRP2 (135)), Organische Anionentransporter (OATP) oder das *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP). Bezüglich BCRP fehlt allerdings noch der Nachweis des AED-Transportes; erste Ergebnisse zeigen keine Transporteigenschaft für CBZ, Clobazam (CLB), Ethosuximid (ESM), LTG, PB, PHT, Primidon (PRM) und VPA (29). Darüber hinaus war BCRP im normalen und epileptischen Gewebe nicht unterschiedlich exprimiert (15). Diese Proteine könnten in Kombination mit Pgp an der BHS wirksam sein und es damit erschweren, die einzelnen beobachteten Medikamenteneffekte bzw. die Pharmakoresistenz nur Pgp zuzuschreiben. Zusätzlich könnten intrazelluläre Transportprozesse, wie z.B. durch die spezielle Zellorganelle *Major Vault Protein* (MVP), in der Entwicklung der Pharmakoresistenz eine Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um einen großen Ribonucleotidproteinpartikel, identisch mit dem *Lung-Resistance-Related-Protein* (LRRP), dessen Aufgabe der bidirektionale Nucleo-cytoplasmatische Austausch und vesikuläre Transport von Komponenten wie Zytostatika ist. In Pgp-negativen, pharmakoresistenten Tumorzellen sind MVP häufig überexprimiert ((20), (90), (156), (195)). In einem Rattenmodell für die TLE konnte mittels Status epilepticus (SE) eine Hochregulation von MVP-RNA gezeigt werden (195). Auch in morphologischen

Korrelaten für therapieresistente Epilepsien, wie z.B. Hippokampussklerose oder FCD, wurde eine Hochregulation von MVP auf den Hilusneuronen oder dysplastischen Neuronen beobachtet (176). Der Nachweis des Transports von AED mittels MVP steht aber noch aus. Sisodiya und Kollegen untersuchten Hirnresektate von Epilepsiepatienten mit Hippokampussklerose oder FCD Typ IIb. Dabei stellten sie fest, dass neben Pgp auch BCRP und MVP am Kapillarendothel gemeinsam lokalisiert waren (177). Dies könnte die Hypothese stützen, dass an der Medikamentenresistenz mehrere Transporter beteiligt sind und im Konzert zu einer pharmakoresistenten Epilepsie führen.

Des Weiteren sind auch Cytokinpolymorphismen der Interleukine IL-1beta, IL-1alpha und IL-1RA mit therapieresistenter Epilepsie assoziiert worden ((74), (87), (130)). In diesem Zusammenhang kann eine exzessive neuronale Aktivität (z.B. Anfälle) direkt die Cytokinexpression verstärken ((9), (74)).

Um bei Epilepsiepatienten eine Prognose bezüglich des pharmakologischen Therapieansprechens zu stellen, eignet sich nach unseren Ergebnissen, die in Einklang mit Tan, Sills und Kim sind, der C3435T-Polymorphismus alleine nicht ((92), (169), (188)). Hinsichtlich der MDR1-Polymorphismen liegt die Bedeutung daher offensichtlich eher in den verschiedenen Haplotypen, die miteinander im *linkage disequilibrium* stehen. In Anbetracht der Ergebnisse von Zimprich und Kollegen moduliert das MDR1 Gen die Pharmakoresistenz, dürfte sie aber nicht alleine verursachen und ist daher als alleiniger Prognosemarker nicht geeignet (209).

VI. Zusammenfassung

Trotz der Weiterentwicklung von Antiepileptika (AED) gibt es unverändert ca. 20 – 30% therapieresistente Epilepsiepatienten. Und dies, obwohl die AED unterschiedlich wirken, was auf einen umfassenden Wirkmechanismus der Pharmakoresistenz hindeutet. Eine genaue Erklärung fehlt bislang; es gibt nur Hypothesen wie die Target- und die MDR1 Rezeptor-Hypothese. Könnte der Mechanismus für die Pharmakoresistenz gefunden werden, würde sich dies entscheidend auf die Behandlung dieser therapieresistenten Patienten auswirken. Daher gewinnt die Pharmakogenetik bzw. Pharmakogenomik in der Forschung zunehmend an Beachtung. Dahinter steht die Idee, dass verschiedene genetische Veränderungen zu einer Änderung der Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik von Medikamenten führen, indem sie den Phänotyp des Patienten beeinflussen. So konnten zahlreiche verschiedene Polymorphismen in Genen von metabolisierenden Enzymen gefunden werden. Durch Testung auf entsprechende Polymorphismen, die in Studien als Prognosefaktor entdeckt wurden, könnte dann das Konzept einer individualisierten Pharmakotherapie für den jeweiligen Patienten entwickelt werden, wie es in der Chemotherapie bereits begonnen wurde (43).

In den letzten Jahren ist der Multidrugrezeptor MDR1 (auch Pgp genannt) zunehmend in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Diese Effluxpumpe wurde im Verlauf auch an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) lokalisiert und einige AED sind Substanzen für MDR1. In weiteren Untersuchungen wurden bislang zahlreiche Polymorphismen für MDR1 gefunden und von Hoffmeyer eine Assoziation zwischen den C3435T Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) und der Expression von Pgp beschrieben (70). Hinsichtlich dieser Assoziation fanden sich im weiteren Verlauf widersprüchliche Ergebnisse ((68),(82),(94)). Des Weiteren ist der mögliche funktionelle Mechanismus des stillen Polymorphismus C3435T bislang immer noch ungeklärt, so dass zum jetzigen Zeitpunkt der mögliche therapeutische Wert für eine individuelle Pharmakotherapie aufgrund des entsprechenden SNP C3435T rein spekulativ ist. Bezüglich einer Assoziation von SNP des C3435T MDR1 mit Pharmakoresistenz liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Möglicherweise könnten die unterschiedlichen Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudien teilweise auf Unterschiede im *linkage disequilibrium* zurückzuführen sein, da C3435T auch in

Zusammenhang zu anderen SNP des MDR1 Genes wie z.B. G2667T/A einer Missense Mutation steht. Hierzu sind weitere Studien zur Pgp Expression bei unterschiedlichen Haplotypenkonstellationen an einer größeren Studienpopulation nötig ((32), (76), (81), (84), (207)).

In Anlehnung an die Studie von Siddiqui und Kerb (165) sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, **ob Korrelationen** zwischen dem **Genotyp** des **Patienten mit Nebenwirkung, Wirkung und Therapieansprechen gebildet werden können**.

Es wurden 231 Patienten aus dem Behandlungszentrum Vogtareuth, Abteilung Neuropädiatrie mit einer seit Kindheit bestehenden Epilepsie im Zeitraum Juli 2004 bis September 2005 rekrutiert. Die Einteilung erfolgte in eine Studiengruppe (> 3AED, nicht anfallsfrei = mindestens 1 Anfall/Woche, Paroxysmen im EEG und/oder epilepsiechirurgischer Eingriff) und eine Kontrollgruppe (anfallsfrei > 6 Monate; nicht mehr als 3 AED und unter dem 3. AED anfallsfrei).

Die Untersuchung o. g. Fragestellung wurde in vier Schritten durchgeführt:

1. Vergleich der Studien- zur Kontrollgruppe
2. Vergleich der homozygoten Genotypen des MDR1 Polymorphismus C3435T
3. Subgruppenanalyse der MDR1 spezifischen AED
4. Haplotypenanalyse für die MDR1 Polymorphismen C1236T, G2677T/A und C3435T

Ergebnisse:

Nebenwirkungen:

Hinsichtlich der **Anzahl der Nebenwirkungen** zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der CC- und in der TT-Gruppe des C3435T-Polymorphismuses. In der CC-Gruppe wurden die AED statistisch signifikant häufiger wegen aufgetretener Nebenwirkungen abgesetzt in Einklang mit den Beobachtungen, dass der CC-Polymorphismus außerhalb des epileptogenen Fokus jedoch normal exprimiert ist und so der AED-Spiegel die NW-Grenze erreichen könnte (174).

Bezüglich der **Nebenwirkungen** in der Subgruppenanalyse der MDR1 spezifischen AED waren nach Bonferroni-Korrektur die Ergebnisse nicht mehr statistisch signifikant.

Wirkung:

Die antikonvulsive **Therapie** war in der TT-Gruppe des C3435T MDR1 Polymorphismus wirksamer. Hier zeigte sich in Einklang mit der Hypothese, dass der TT-Typ weniger AED wieder über die BHS ins Blut zurücktransportiert und so ausreichende Wirkspiegel erreicht werden können, statistisch signifikant häufiger eine Anfallsfreiheit (nach Bonferroni-Korrektur jedoch nicht mehr statistisch signifikant).

Gegen diese Hypothese spricht die statistisch signifikante Angabe der 50% Anfallsreduktion in der CC-Gruppe, die auch nach Bonferroni-Korrektur statistisch signifikant blieb.

Einschränkend ist hier aber anzumerken, dass ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der fehlenden Wirksamkeitsangaben in der TT-Gruppe bestand ($p=0,0014$; Odds Ratio: 2,373; 95% CI: 1,417 – 3,974), so dass gerade durch die fehlenden Angaben in der TT-Untergruppe die Ergebnisse nur eingeschränkt auswertbar sind.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse – einmal zeigt der TT-Typ eine Assoziation mit Wirkverlust bzw. Anfallspersistenz auf der anderen Seite ist er assoziiert mit Anfallsfreiheit - könnten auch auf der Tatsache beruhen, dass einerseits die Nebenwirkungen von den Patienten angegeben wurden, andererseits der Therapieeffekt aber zusätzlich durch die behandelnden Ärzte beurteilt wurde und das es sich bei unserer GEPAED-Studie um eine retrospektive Untersuchung handelte. Zusätzlich hatte die TT-Gruppe statistisch signifikant weniger (auch nach Bonferroni-Korrektur) Angaben zur Medikamentenwirksamkeit abgegeben und es zeigte sich eine Tendenz von weniger Angaben zum Absetzungsgrund in der TT-Gruppe, die die Wirksamkeit der Medikation nur eingeschränkt beurteilen lassen.

Hinsichtlich einer möglichen **Toleranzentwicklung** zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied nur zwischen den beiden Studiengruppen jedoch kein

statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden homozygoten Polymorphismen des C3435T.

Therapieansprechen:

Die Studien- und die Kontrollgruppe wiesen ähnlich häufig den MDR1 TT- und CC-Polymorphismus (67,6% vs. 66,7%) auf. Auch für die beiden anderen Polymorphismen C1236T und G2677T/A bestand kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Auftretens in den beiden Gruppen (G2677T/A: GG-Genotyp 28,1% vs. 31% und TT-Genotyp 18,1% vs. 12,7%; C1236T: CC-Genotyp 25,6% vs. 31% und TT-Genotyp 18,1% vs. 15,5% /jeweils Studiengruppe vs. Kontrollgruppe). Die Haplotypenanalyse zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe. Die am häufigsten zu beobachtenden Haplotypen waren TTT, CGC, CGT und TTC.

Damit ergab sich keine Assoziation der Pharmakoresistenz mit einem MDR1-Polymorphismus. Unsere Ergebnisse sind somit im Einklang mit den Ergebnissen von Tan et al., Sills et al., Kim et al und Shahwan et al. ((92), (163); (169), (188)). Wie auch diese Gruppen konnten wir die Ergebnisse von Siddiqui et al. nicht wiederholen (165).

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend spielen für die pharmakoresistente Epilepsie neben Genetik sicherlich auch krankheitsbezogene und medikamentenbezogene Mechanismen eine Rolle. Bezüglich des MDR1-Polymorphismus ist seine Bedeutung als Therapieeffektmarker noch nicht abschließend zu beurteilen. In Anbetracht der Ergebnisse von Zimprich und Kollegen moduliert das MDR1 Gen die Pharmakoresistenz, dürfte sie aber nicht alleine verursachen und ist daher als alleiniger Prognosemarker nicht geeignet (209). Auch in unserer Arbeit konnten wir keine Assoziationen mit einer Pharmakoresistenz nachweisen.

In der Zukunft sind weitere Studien auf Kandidatengene bezüglich des Medikamentenansprechens nötig. Dabei dürfen aber die komplexen Interaktionen verschiedener, an der Absorption, Verstoffwechslung etc. des Medikaments beteiligter Gene, nicht außer Acht gelassen werden, um auch Interaktionen zwischen

verschiedenen Polymorphismen zu erkennen ((60), (107)). Zusätzlich sind bei zukünftigen Studien auch die verschiedenen klinischen Charakteristika der epileptischen Syndrome sowie die verwendeten AED und ihre Dosierungen zu berücksichtigen, da sie alle das Therapieansprechen beeinflussen können (185). Zur Interpretation der Ergebnisse von genetischen Assoziationsdaten sind generelle Analysestandards und einheitliche Definitionen nötig, die dann konsequent in allen zukünftigen Studien angewendet werden (53). Mittels dieser zukünftigen Studien können auch neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Epilepsie erzielt werden (172).

VII. Literaturverzeichnis

- (1) Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1981;22:489-501.
- (2) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1989;30:389-99.
- (3) Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1993;34:592-6.
- (4) Practice parameter: a guideline for discontinuing antiepileptic drugs in seizure-free patients--summary statement. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 1996;47:600-2.
- (5) ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: future directions. International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1997;38:614-8.
- (6) Recommendations for neuroimaging of patients with epilepsy. Commission on Neuroimaging of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1997;38:1255-6.
- (7) Aicardi J. *Epilepsy in Children*. The International Review of Child Neurology 2nd ed.
- (8) Ak H, Ay B, Tanriverdi T, Sanus GZ, Is M, Sar M et al. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in patients with focal cortical dysplasia. *Seizure*. 2007;16:493-503.
- (9) Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:734-44.
- (10) Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-98.
- (11) Anderson GD, Graves NM. Drug interaction with antiepileptic agents. Prevention and management. *CNS Drugs* 2, 268-79. 94.
- (12) Annegers JF, Hauser WA, Elveback LR. Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 1979;20:729-37.
- (13) Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Leenstra S et al. Expression

- and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience*. 2003;118:417-29.
- (14) Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gerceker F, van Vliet EA et al. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2004;45:441-51.
 - (15) Aronica E, Gorter JA, Redeker S, van Vliet EA, Ramkema M, Scheffer GL et al. Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia*. 2005;46:849-57.
 - (16) Basic S, Hajnsek S, Poljakovic Z, Basic M. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*. 2006;47:449; author reply 450.
 - (17) Bauer B, Hartz AM, Fricker G, Miller DS. Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol*. 2004;66:413-9.
 - (18) Bendayan R, Lee G, Bendayan M. Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microsc Res Tech*. 2002;57:365-80.
 - (19) Berg AT, Kelly MM. Defining intractability: comparisons among published definitions. *Epilepsia*. 2006;47:431-6.
 - (20) Berger W, Spiegl-Kreinecker S, Buchroithner J, Elbling L, Pirker C, Fischer J et al. Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells. *Int J Cancer*. 2001;94:377-82.
 - (21) Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology*. 2001;57:1153-4.
 - (22) Brodie MJ, Dichter MA. Antiepileptic drugs. *N Engl J Med*. 1996;334:168-75.
 - (23) Brodie MJ, Shorvon SD, Canger R, Halasz P, Johannessen S, Thompson P et al. Commission on European Affairs: appropriate standards of epilepsy care across Europe. ILEA. *Epilepsia*. 1997;38:1245-50.
 - (24) Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med*. 1998;4:1166-72.
 - (25) Burt RK, Thorgeirsson SS. Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80:1383-6.

- (26) Callen, D. F., Baker, F., and Simmers, R. N. et al. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* 77, 142-144. 87.
- (27) Camfield, C. S. and Camfield, P. R. Good News - a population based study indicates that SUDEP is very unusual in childhood onset epilepsy. *Epilepsia* 49(Suppl. 7), 159. 99.
- (28) Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:169-74.
- (29) Cervený L, Pavek P, Malakova J, Staud F, Fendrich Z. Lack of interactions between breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) and selected antiepileptic agents. *Epilepsia*. 2006;47:461-8.
- (30) Chaudhary PM, Roninson IB. Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol Res.* 1992;4:281-90.
- (31) Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1990;265:221-6.
- (32) Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;60:159-71.
- (33) Cockerell OC, Sander JW, Shorvon SD. Remission of epilepsy. The NGPS. National General Practice Study of Epilepsy. *Lancet.* 1995;346:1228.
- (34) Cohen SN, Weber WW. Pharmacogenetics. *Pediatr Clin North Am.* 1972;19:21-36.
- (35) Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:695-8.
- (36) Cornford EM. Epilepsy and the blood brain barrier: endothelial cell responses to seizures. *Adv Neurol.* 1999;79:845-62.
- (37) Cornford EM, Oldendorf WH. Epilepsy and the blood-brain barrier. *Adv Neurol.* 1986;44:787-812.
- (38) Cornwell MM, Smith DE. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. *J Biol Chem.* 1993;268:19505-11.
- (39) Dahlman I, Eaves IA, Kosoy R, Morrison VA, Heward J, Gough SC et al. Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat Genet.* 2002;30:149-50.

- (40) Demeule M, Regina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F et al. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:339-48.
- (41) Dicato M, Duhem C, Pauly M, Ries F. Multidrug resistance: molecular and clinical aspects. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1997;3:91-9.
- (42) Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*. 2001;42:1501-6.
- (43) Donnelly JG. Pharmacogenetics in cancer chemotherapy: balancing toxicity and response. *Ther Drug Monit*. 2004;26:231-5.
- (44) Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hofmann U, Schwab M, Brinkmann U et al. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53:526-34.
- (45) Dresser GK, Schwarz UI, Wilkinson GR, Kim RB. Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73:41-50.
- (46) Duncan R, Todd N. Epilepsy and the blood-brain barrier. *Br J Hosp Med*. 1991;45:32-4.
- (47) Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ et al. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68:598-604.
- (48) Elger CE. Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 5:9-15.
- (49) Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, van Waarde A. PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des*. 2004;10:1493-503.
- (50) Eriksson KJ, Koivikko MJ. Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. *Epilepsia*. 1997;38:1275-82.
- (51) Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chirikuri A, O'Toole D et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology*. 2000;118:279-88.
- (52) Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 2002;359:30-6.
Notes: CORPORATE NAME: Swiss HIV Cohort Study.

- (53) Ferraro TN, Dlugos DJ, Buono RJ. Challenges and opportunities in the application of pharmacogenetics to antiepileptic drug therapy. *Pharmacogenomics*. 2006;7:89-103.
- (54) Ford, J. M., Yang, J-M, and Hait, W. N. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: experimental and clinical strategies for its reversal. *Cancer Treat Res* 87, 3-38. 96.
- (55) Forsgren L, Bucht G, Eriksson S, Bergmark L. Incidence and clinical characterization of unprovoked seizures in adults: a prospective population-based study. *Epilepsia*. 1996;37:224-9.
- (56) Frey HH, Loscher W. Distribution of valproate across the interface between blood and cerebrospinal fluid. *Neuropharmacology*. 1978;17:637-42.
- (57) Gant TW, Silverman JA, Thorgeirsson SS. Regulation of P-glycoprotein gene expression in hepatocyte cultures and liver cell lines by a trans-acting transcriptional repressor. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:2841-6.
- (58) Gibbs JP, Adeyeye MC, Yang Z, Shen DD. Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport. *Epilepsy Res*. 2004;58:53-66.
- (59) Glue P, Sulowicz W, Colucci R, Banfield C, Pai S, Lin C, Afrime MB. Single-dose pharmacokinetics of felbamate in patients with renal dysfunction. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44: 91-3.
- (60) Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*. 2003;4:937-47.
- (61) Gottesman M. M. and Fojo T., Bates S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (1): 48-58.
- (62) Gugler R, Schell A, Eichelbaum M, Fröscher W, Schulz HU. The disposition of valproic acid in man. *Europ J Clin Pharmacol* 1977;12 (2): 125-32.
- (63) Gugler R, Schell A, Fröscher W, Schulz HU. Oral disposition of valproic acid following single and multiple doses. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Exp Path Pharmacol* 1977; 297(Suppl 12): 62.
- (64) Gutmann H, Bruggisser R, Schaffner W, Bogman K, Botomino A, Drewe J. Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier in vitro. *Planta Med*. 2002;68:804-7.
- (65) Hauser WA, Annegers JF, Elveback LR. Mortality in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 1980;21:399-412.
- (66) Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*. 1993;34:453-68.
- (67) Heinemann U, Dreier J, Leschinger A, Stabel J, Draguhn A, Zhang C. Effects of anticonvulsant drugs on hippocampal neurons. *Hippocampus*. 1994;4:291-6.

- (68) Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics*. 2001;11:293-8.
- (69) Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Hum Mol Genet*. 2006;15:797-805.
- (70) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3473-8.
- (71) Holmes GL. The interface of preclinical evaluation with clinical testing of antiepileptic drugs: role of pharmacogenomics and pharmacogenetics. *Epilepsy Res*. 2002;50:41-54.
- (72) Honda Y, Ushigome F, Koyabu N, Morimoto S, Shoyama Y, Uchiumi T et al. Effects of grapefruit juice and orange juice components on P-glycoprotein- and MRP2-mediated drug efflux. *Br J Pharmacol*. 2004;143:856-64.
- (73) Huai-Yun H, Secrest DT, Mark KS, Carney D, Brandquist C, Elmquist WF et al. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243:816-20.
- (74) Hultkonen J, Koskikallio E, Rainesalo S, Keranen T, Hurme M, Peltola J. The balance of inhibitory and excitatory cytokines is differently regulated in vivo and in vitro among therapy resistant epilepsy patients. *Epilepsy Res*. 2004;59:199-205.
- (75) Hung CC, Jen Tai J, Kao PJ, Lin MS, Liou HH. Association of polymorphisms in NR1I2 and ABCB1 genes with epilepsy treatment responses. *Pharmacogenomics*. 2007;8:1151-58.
- (76) Hung CC, Tai JJ, Lin CJ, Lee MJ, Liou HH. Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. *Pharmacogenomics*. 2005;6:411-7.
- (77) Iannetti P, Spalice A, Parisi P. Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus. *Epilepsia*. 2005;46:967-9.
- (78) Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43:553-76.
- (79) Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S et al. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res*. 2002;62:4955-62.
- (80) Isojärvi JIT, Pakarinen AJ, Myllylä VV. Basic haematological parameters, serum gamma-

glutamyl-transferase activity and erythrocyte folate and serum vitamin B12 levels during carbamazepin and oxcarbazepine therapy. *Seizure* 1997; 6(3): 207-11.

- (81) Jamrozik K, Balcerzak E, Cebula B, Kowalczyk M, Panczyk M, Janus A et al. Multi-drug transporter MDR1 gene polymorphism and prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacol Rep.* 2005;57:882-8.
- (82) Jamrozik K, Robak T. Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies. *Hematology.* 2004;9:91-105.
- (83) Jette L, Murphy GF, Leclerc JM, Beliveau R. Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1701-9.
- (84) John A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C et al. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:584-94.
- (85) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455:152-62.
- (86) Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol.* 2003;22:1117-21.
- (87) Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 2000;47:571-4.
- (88) Kerb R, Aynacioglu AS, Brockmoller J, Schlagenhauser R, Bauer S, Szekeres T et al. The predictive value of MDR1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *Pharmacogenomics J.* 2001;1:204-10.
- (89) Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics.* 2001;2:51-64.
- (90) Kickhoefer VA, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ, Rome LH. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem.* 1998;273:8971-4.
- (91) Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:189-99.
- (92) Kim YO, Kim MK, Woo YJ, Lee MC, Kim JH, Park KW et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics. *Seizure.* 2006;15:67-72.

- (93) Kirchheiner J, Fuhr U, Brockmoller J. Pharmacogenetics-based therapeutic recommendations--ready for clinical practice? *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:639-47.
- (94) Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics.* 2003;13:481-94.
Notes: CORPORATE NAME: Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators.
- (95) Krämer G, Bülow P, Blankenhorn V, Stoll KD. Oxcarbazepin und Carbamazepin. Kinetik, Metabolismus, Enzyminduktion und Konsequenzen für den klinischen Einsatz. *Münch Med Wochenschr* 1990; 132: 71-4.
- (96) Kubota H, Ishihara H, Langmann T, Schmitz G, Stieger B, Wieser HG et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* 2006;68:213-28.
- (97) Kurtz Z, Tookey P, Ross E. Epilepsy in young people: 23 year follow up of the British national child development study. *BMJ.* 1998;316:339-42.
- (98) Kwan P, Baum L, Wong V, Ng PW, Lui CH, Sin NC et al. Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. *Epilepsy Behav.* 2007;11:112-7.
- (99) Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med.* 2000;342:314-9.
- (100) Kwan P, Brodie MJ. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure.* 2002;11:77-84.
- (101) Kwan P, Brodie MJ. Drug treatment of epilepsy: when does it fail and how to optimize its use? *CNS Spectr.* 2004;9:110-9.
- (102) Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia.* 2005;46:224-35.
- (103) Kwan P, Sills GJ, Butler E, Gant TW, Meldrum BS, Brodie MJ. Regional expression of multidrug resistance genes in genetically epilepsy-prone rat brain after a single audiogenic seizure. *Epilepsia.* 2002;43:1318-23.
- (104) Lardizabal, D. V., Jacobson, B., and Ying, Z. et al. Multidrug resistance-1 (MDR1) protein expression in Rasmussen encephalitis (Abstract) . *Epilepsia* 2003; 44(Suppl. 9): 35-6.
- (105) Lazarowski A, Sevlever G, Taratuto A, Massaro M, Rabinowicz A. Tuberous sclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy. *Pediatr Neurol.* 1999;21:731-4.
- (106) Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R. Drug transporters in the central nervous system: brain

- barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev.* 2001;53:569-96.
- (107) Leschziner G, Zabaneh D, Pirmohamed M, Owen A, Rogers J, Coffey AJ et al. Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16:439-50.
- (108) Little J, Bradley L, Bray MS, Clyne M, Dorman J, Ellsworth DL et al. Reporting, appraising, and integrating data on genotype prevalence and gene-disease associations. *Am J Epidemiol.* 2002;156:300-10.
- (109) Llorente L, Richaud-Patin Y, Diaz-Borjon A, Alvarado de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, de la Fuente H et al. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine.* 2000;67:30-9.
- (110) Loscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301:7-14.
- (111) Loscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx.* 2005;2:86-98.
- (112) Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:591-602.
- (113) Luders H, Acharya J, Baumgartner C, Benbadis S, Bleasel A, Burgess R et al. Semiological seizure classification. *Epilepsia.* 1998;39:1006-13.
- (114) Luer MS, Hamani C, Dujovny M, Gidal B, Cwik M, Deyo K et al. Saturable transport of gabapentin at the blood-brain barrier. *Neurol Res.* 1999;21:559-62.
- (115) MacDonald BK, Johnson AL, Goodridge DM, Cockerell OC, Sander JW, Shorvon SD. Factors predicting prognosis of epilepsy after presentation with seizures. *Ann Neurol.* 2000;48:833-41.
- (116) Marchi N, Guiso G, Rizzi M, Pirker S, Novak K, Czech T et al. A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine. *Epilepsia.* 2005;46:1613-9.
- (117) Marchi N, Hallene KL, Kight KM, Cucullo L, Moddel G, Bingaman W et al. Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. *BMC Med.* 2004;2:37.
- (118) Meldrum BS. Anatomy, physiology, and pathology of epilepsy. *Lancet.* 1990;336:231-4.
- (119) Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W et al. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood.* 1998;91:1749-56.

- (120) Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochem Pharmacol*. 2003;65:1843-52.
- (121) Morris GL 3rd, Mueller WM. Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05. *Neurology*. 1999;53:1731-5.
- (122) MOTULSKY AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*. 1957;165:835-7.
- (123) Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;71:297-303.
- (124) Nashef L. Sudden unexpected death in epilepsy: Terminology and Definitions. *Epilepsia* 1997; 38 (Suppl.11): 6-8.
- (125) Nguyen KT, Liu B, Ueda K, Gottesman MM, Pastan I, Chin KV. Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants. *Oncol Res*. 1994;6:71-7.
- (126) Noachtar S, Rosenow F, Arnold S, Baumgartner C, Ebner A, Hamer H et al. [Semilogic classification of epileptic seizures]. *Nervenarzt*. 1998;69:117-26.
- (127) Owen A, Pirmohamed M, Tettey JN, Morgan P, Chadwick D, Park BK. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;51:345-9.
- (128) Pardridge WM, Golden PL, Kang YS, Bickel U. Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem*. 1997;68:1278-85.
- (129) Pechadre JC, Sauvezie B, Osier C, Gibert J. [The treatment of epileptic encephalopathies with gamma globulin in children (author's transl)]. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin*. 1977;7:443-7.
- (130) Peltola J, Keranen T, Rainesalo S, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-1 gene complex in localization-related epilepsy. *Ann Neurol*. 2001;50:275-6.
- (131) Perucca E. The new generation of antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *Br J Clin Pharmacol*. 1996;42:531-43.
- (132) Potschka H, Baltes S, Loscher W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res*. 2004;58:85-91.
- (133) Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated

- protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport*. 2001;12:3557-60.
- (134) Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci Lett*. 2002;327:173-6.
- (135) Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:124-31.
- (136) Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats. *Epilepsia*. 2003;44:1479-86.
- (137) Potschka H, Loscher W. In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. *Epilepsia*. 2001;42:1231-40.
- (138) Potschka H, Volk HA, Loscher W. Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats. *Neuroreport*. 2004;15:1657-61.
- (139) Ramachandran V, Shorvon SD. Clues to the genetic influences of drug responsiveness in epilepsy. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 1:33-7.
- (140) Rambeck B, Jurgens UH, May TW, Pannek HW, Behne F, Ebner A et al. Comparison of brain extracellular fluid, brain tissue, cerebrospinal fluid, and serum concentrations of antiepileptic drugs measured intraoperatively in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47:681-94.
- (141) Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res*. 1999;34:109-22.
- (142) Remy S, Gabriel S, Urban BW, Dietrich D, Lehmann TN, Elger CE et al. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol*. 2003;53:469-79.
- (143) Richens A. Liver enzyme induction by antiepileptic drugs: its clinical significance. In: *Anticonvulsant Drugs and Enzyme Induction*. Richens A, Woodford FP (eds). Amsterdam: Excerpta Medica 1976.
- (144) Rizzi M, Caccia S, Guiso G, Richichi C, Gorter JA, Aronica E et al. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci*. 2002;22:5833-9.
- (145) Sachdeo RC. Topiramate. Clinical profile in epilepsy. *Clin Pharmacokinetic* 1998; 34: 335-46.
- (146) Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T et al. MDR1

- genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* 2001;18:1400-4.
- (147) Samoto K, Ikezaki K, Yokoyama N, Fukui M. P-glycoprotein expression in brain capillary endothelial cells after focal ischaemia in the rat. *Neurol Res.* 1994;16:217-23.
- (148) Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia.* 1993;34:1007-16.
- (149) Sander JW, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;61:433-43.
- (150) Sasongko L, Link JM, Muzi M, Mankoff DA, Yang X, Collier AC et al. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77:503-14.
- (151) Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;36:179-94.
- (152) Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4028-33.
- (153) Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1996;97:2517-24.
- (154) Schmidt D, Loscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia.* 2005;46:858-77.
- (155) Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B, Kauffmann HM. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol Lett.* 2001;120:51-7.
- (156) Schroeijers AB, Siva AC, Scheffer GL, de Jong MC, Bolick SC, Dukers DF et al. The Mr 193,000 vault protein is up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000;60:1104-10.
- (157) Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 1996;49:311-8.
- (158) Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2003;124:26-33.
- (159) Seegers U, Potschka H, Loscher W. Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or

- phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions. *Eur J Pharmacol.* 2002;451:149-55.
- (160) Seegers U, Potschka H, Loscher W. Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002;51:257-68.
- (161) Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem.* 1998;251:252-61.
- (162) Seo T, Ishitsu T, Ueda N, Nakada N, Yurube K, Ueda K et al. ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients. *Pharmacogenomics.* 2006;7:551-61.
- (163) Shahwan A, Murphy K, Doherty C, Cavalleri GL, Muckian C, Dicker P et al. The controversial association of ABCB1 polymorphisms in refractory epilepsy: An analysis of multiple SNPs in an Irish population. *Epilepsy Res.* 2007; 73 (2): 192 - 198.
- (164) Shapiro AB, Ling V. The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1998;643:227-34.
- (165) Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med.* 2003;348:1442-8.
- (166) Siegmund M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M et al. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1847-54.
- (167) Siemes H, Bourgeois BFD . *Anfälle und Epilepsien bei Kindern und Jugendlichen.* - Stuttgart; New York: Thieme. 2001.
- (168) Sills GJ, Kwan P, Butler E, de Lange EC, van den Berg DJ, Brodie MJ. P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in *mdr1a* knockout mice. *Epilepsy Behav.* 2002;3:427-32.
- (169) Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, McCrindle S, Collier L, Wilson EA et al. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia.* 2005;46:643-7.
- (170) Simon C, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mueller S, Fritschy JM et al. Intestinal expression of cytochrome P450 enzymes and ABC transporters and carbamazepine and phenytoin disposition. *Acta Neurol Scand.* 2007;115:232-42.
- (171) Sisodiya SM. Mechanisms of antiepileptic drug resistance. *Curr Opin Neurol.* 2003;16:197-201.

- (172) Sisodiya SM. Genetics of drug resistance. *Epilepsia*. 2005;46 Suppl 10:33-8.
- (173) Sisodiya SM, Heffernan J, Squier MV. Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport*. 1999;10:3437-41.
- (174) Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*. 2002;125:22-31.
- (175) Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, Thom M. Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet*. 2001;357:42-3.
- (176) Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, van der Valk P, Cross JH, Scheper RJ et al. Major vault protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. *Epilepsia*. 2003;44:1388-96.
- (177) Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, van der Valk P, Scheper RJ, Harding BN et al. Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32:51-63.
- (178) Soranzo N, Cavalleri GL, Weale ME, Wood NW, Depondt C, Marguerie R et al. Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multidrug resistance gene. *Genome Res*. 2004;14:1333-44.
- (179) Soranzo N, Goldstein DB, Sisodiya SM. The role of common variation in drug transporter genes in refractory epilepsy. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6:1305-12.
- (180) Sperling MR. The consequences of uncontrolled epilepsy. *CNS Spectr*. 2004;9:98-101, 106-9.
- (181) Spurr NK. Pharmacogenetic studies of epilepsy drugs: are we there yet? *Trends Genet*. 2006;22:250-2.
- (182) Staudinger JL, Madan A, Carol KM, Parkinson A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:523-7.
- (183) Stevenson IH, O'Malley Sheperd AMM. Relative induction potency of anticonvulsant drugs. In: *Anticonvulsant Drugs and Enzyme Induction*. Richens A, Woodford FP (eds). Amsterdam: Excerpta Medica 1976.
- (184) Summers MA, Moore JL, McAuley JW. Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Ann Pharmacother*. 2004;38:1631-4.
- (185) Szoek CE, Newton M, Wood JM, Goldstein D, Berkovic SF, O'Brien TJ et al. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. *Lancet Neurol*. 2006;5:189-96.
- (186) Tai HL. Technology evaluation: Valspodar, Novartis AG. *Curr Opin Mol Ther*. 2000;2:459-67.

- (187) Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K et al. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:1179-87.
- (188) Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, Pelekanos JT, McMahon JM, Vears DF et al. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy. *Neurology*. 2004;63:1090-2.
- (189) Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297:1137-43.
- (190) Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5507-12.
- (191) Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*. 1995;36:1-6.
- (192) Truant R, Xiao H, Ingles CJ, Greenblatt J. Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein. *J Biol Chem*. 1993;268:2284-7.
- (193) Turner D, Choudhury F, Reynard M, Railton D, Navarrete C. Typing of multiple single nucleotide polymorphisms in cytokine and receptor genes using SNaPshot. *Hum Immunol*. 2002;63:508-13.
- (194) van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics*. 2001;11:287-91.
- (195) van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Gorter JA. Expression and cellular distribution of major vault protein: a putative marker for pharmacoresistance in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2004;45:1506-16.
- (196) van Vliet EA, van Schaik R, Edelbroek PM, Redeker S, Aronica E, Wadman WJ et al. Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats. *Epilepsia*. 2006;47:672-80.
- (197) van Vliet EA, van Schaik R, Edelbroek PM, Voskuyl RA, Redeker S, Aronica E et al. Region-specific overexpression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322:141-7.
- (198) Volk HA, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, Loscher W. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures.

Neuroscience. 2004;123:751-9.

- (199) Volk HA, Loscher W. Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain*. 2005;128:1358-68.
- (200) Volk HA, Potschka H, Loscher W. Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res*. 2004;58:67-79.
- (201) Wang EJ, Barecki-Roach M, Johnson WW. Quantitative characterization of direct P-glycoprotein inhibition by St John's wort constituents hypericin and hyperforin. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56:123-8.
- (202) Wang-Tilz Y, Tilz C, Wang B, Tilz GP, Stefan H. Influence of lamotrigine and topiramate on MDR1 expression in difficult-to-treat temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47:233-9.
- (203) Wang Y, Zhou D, Wang B, Li H, Chai H, Zhou Q et al. A kindling model of pharmacoresistant temporal lobe epilepsy in Sprague-Dawley rats induced by Coriaria lactone and its possible mechanism. *Epilepsia*. 2003;44:475-88.
- (204) Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, Dormann SM, Haefeli WE. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307:262-7.
- (205) Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation*. 2002;74:571-2.
- (206) Zhang L, Ong WY, Lee T. Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainate injections. *Exp Brain Res*. 1999;126:509-16.
- (207) Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J et al. The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients. *Hum Immunol*. 2002;63:765-70.
- (208) Zhu HJ, Liu GQ. Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism. *Life Sci*. 2004;75:1313-22.
- (209) Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2004;63:1087-9.
- (210) Zschoke S. *Klinische Elektroenzephalographie*; 2. Auflage - Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hong Kong; London; Mailand; Paris; Tokio: Springer. 2002.

VIII. Anhang

1. Genetik-Terminologie

Genom:	die gesamte DNA-Sequenz eines Individuums
Proteom:	das komplette Set von RNA, welches von dem Genom abgeschrieben wird
Allel:	verschiedene Formen von Genen oder verschiedene DNA-Sequenzen an identischer Lokalisation auf einem Chromosom. Jede menschliche Zelle hat ein Allel von der Mutter und eins vom Vater.
Haplotyp:	bestimmte Kombination von Allelen einer bestimmten Region eines Chromosoms
Homozygot:	ein Individuum mit den gleichen Allelen an korrespondierenden Loci auf dem homologen Chromosom
Heterozygot:	ein Individuum mit verschiedenen Allelen an korrespondierenden Loci auf dem homologen Chromosom
Linkage:	die Tendenz von Genen, gemeinsam vererbt zu werden, als Ergebnis ihrer Lokalisation auf dem gleichen Chromosom; gemessen mittels Prozent Rekombination zwischen zwei Orten (Loci)
Linkage Disequilibrium:	einige Kombinationen von genetischen Markern treten mehr oder weniger häufiger auf, als man nach ihrer Lokalisation auf dem Chromosom vermuten würde. Dies

lässt vermuten, dass Gruppen von Markern gemeinsam vererbt werden

Polymorphismus:	Variationen der DNA-Abfolge in einer bestimmten Region des Genoms zwischen Individuen
Single-Nucleotide Polymorphismus (SNP):	<p>die DNA-Abfolge unterscheidet sich in einzelnen Basen; dies kann bei Individuen einer Population beobachtet werden.</p> <p>Vorkommen mindestens 1% oder mehr; wohingegen Mutationen seltene Unterschiede sind, die unter einem Wert von 1% in der Bevölkerung auftreten. SNP verteilen sich über das gesamte menschliche Genom und treten mit einer durchschnittlichen Frequenz von 1 auf 1000 Basenpaare auf. Ihre Mutationsrate ist niedrig</p>
Hardy-Weinberg-Gleichgewicht:	<p>in einer Population bleibt die Häufigkeit verschiedener Allele gleich. Das Gleichgewicht wird nur verschoben durch Selektion, Abwanderung/Zuwanderung oder genetischen Drift.</p> <p>Die Gleichung für die Gesamtheit der Allele in der Population lautet: $p + q = 1$</p> <p>Die Gleichung für die Gesamtheit der Population lautet: $p^2 + 2pq + q^2$</p> <p>wobei q die Häufigkeit des rezessiven und p die Häufigkeit des dominanten Allels ist. Daraus ergibt sich die Häufigkeit homozygoter rezessiver Individuen mit q^2, die der homozygoten dominanten Individuen mit p^2 und die der heterozygoten Individuen mit $2pq$.</p>
Polymerase Chain Reaction (PCR):	Technik, um die Ziel-DNA-Sequenz in ihrer Kopieanzahl um 10^6 zu erhöhen; mittels Zyklen von Denaturierung, Abkühlung mit Primern und Verlängerung durch DNA-Polymerase

cDNA:	eine Einzelstrang-DNA komplementär zu RNA, synthetisiert mittels reverser Transkription
Exon:	kodierender Anteil eines Gens
Intron:	nicht-kodierender Anteil eines Gens
Splicing:	Prozeß, der Introns von der abgeschriebenen RNA entfernt und so nur Exons übrig läßt
Hapten:	ein kleines Molekül, welches durch Bindung an ein Protein zu einem Antigen wird

2. Tabellen:

Tabelle 22: Revidierte Klassifikation der Epilepsien und epileptischen Syndrome (2)

Lokalisationsbezogene Epilepsien und Syndrome:

- idiopathisch (mit altersgebundenem Beginn):
 - gutartige Epilepsie des Kindesalters mit zentrotemporalen Spikes
 - Epilepsie des Kindesalters mit okzipitalen Paroxysmen
 - primäre Leseepilepsie
- symptomatisch:
 - chronisch progrediente Epilepsia partialis continua (Kozevnikov-Syndrom) des Kindesalters
 - Syndrome mit spezifischen Anfallsauslösern (Reflexepilepsien)
 - Temporallappenepilepsie
 - Frontallappenepilepsie
 - Parietallappenepilepsie
 - Okzipitallappenepilepsie
- Kryptogen

Generalisierte Epilepsien und Syndrome:

- idiopathische (mit altersgebundenem Beginn):
 - benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe
 - benigne Neugeborenenkrämpfe
 - benigne myoklonische Epilepsie des Kleinkindesalters
 - Epilepsie mit pyknoleptischen Absencen (Pyknolepsie, Absence-Epilepsie des Kindesalters)
 - juvenile Absence-Epilepsie
 - Impulsiv-Petit-mal-Epilepsie (juvenile myoklonische Epilepsie)
 - Aufwach-Grand-mal-Epilepsie
 - andere generalisierte idiopathische Epilepsien
 - Epilepsien mit spezifischen Anfallsauslösern
- kryptogen oder symptomatisch:
 - Epilepsie mit Blitz-Nick-Salaam-Krämpfen (West-Syndrom)
 - Lennox-Gastaut-Syndrom
 - Epilepsie mit myoklonisch-astatischen Anfällen
 - Epilepsie mit myoklonischen Absencen

Fortsetzung Tabelle 22

- symptomatisch:
 - unspezifische Ätiologie:
 - myoklonische Frühenzephalopathie
 - frühinfantile epileptische Enzephalopathie mit Suppression Burst
 - andere symptomatische generalisierte Epilepsien
- spezifische Syndrome
 - symptomatische Anfälle sind das führende oder vorherrschende Symptom verschiedener Krankheitszustände

Epilepsien und Syndrome, die nicht als fokal oder generalisiert bestimmbar sind:

- mit sowohl generalisierten als auch fokalen Anfällen:
 - Neugeborenenkrämpfe
 - schwere myoklonische Epilepsie des Kleinkindesalters
 - Epilepsie mit anhaltenden Spike-Wave-Entladungen im synchronisierten Schlaf (CSWS-Syndrom)
 - Aphasie-Epilepsie-Syndrom (Landau-Kleffner-Syndrom)
 - andere unbestimmte Epilepsien
- ohne eindeutige generalisierte oder fokale Zeichen:
 - viele Fälle von Schlaf-Grand-Mal

Spezielle Syndrome

Gelegenheitsanfälle:

- Fieberkrämpfe
- isolierte Anfälle oder isolierter Status epilepticus
- Anfälle, die ausschließlich bei akuten metabolischen oder toxischen Ereignissen auftreten mit Faktoren wie Alkohol, Drogen, Eklampsie, nichtketotische Hyperglycinämie

Nächste Seite: **Tabelle 23:** Subgruppenanalyse der von MDR1 transportierten AED in der Studien- und Kontrollgruppe. Die Nebenwirkungen des ZNS wurden einmal gesamt und dann unterteilt für Müdigkeit und Anfallsverschlechterung aufgeschlüsselt. Prozentangaben beziehen sich bei der Aufteilung der Polymorphismen auf die Gesamtgruppe des jeweiligen AED, und bei den NW auf dessen Gesamtheit.

			MDR 1				
AED	Behandlungen	Gruppe	TT-Typ	CC-Typ	CT-Typ	AED-Dosis	AED-Spiegel
CBZ	159	143 R/ 16 Ko	46 (28,9%)	33 (20,8%)	80 (50,3%)	23,8	7,7
		MDR1-Aufteil.	PR: 40/46	PR: 29/33	PR: 74/80		
			Ko: 6/46	Ko: 4/33	Ko: 6/80		
FBM	1	R	1	-	-		
GBP	1	R	-	-	1		
LTG	171	159 R/ 12 Ko	42 (24,6%)	32 (18,7%)	97 (56,7%)	4,5	4,4
		MDR1-Aufteil.	PR: 41/42	PR: 30/32	PR: 88/97		
			Ko: 1/42	Ko: 2/32	Ko: 9/97		
OXC	243	233 R/ 10 Ko	75 (30,9%)	48 (19,8%)	120 (49,4%)	31,2	18,6
		MDR1-Aufteil.	PR: 73/75	PR: 44/48	PR: 116/120		
			Ko: 2/75	Ko: 4/48	Ko: 4/120		
PB	140	133 R/ 7 Ko	40 (28,6%)	27 (19,3%)	73 (52,1%)	7,2	33,5
		MDR1-Aufteil.	PR: 37/40	PR: 25/27	PR: 71/73		
			Ko: 3/40	Ko: 2/27	Ko: 2/73		
PHT	81	81 R	31 (38,3%)	14 (17,3%)	36 (44,4%)	10,1	34,3
		MDR1-Aufteil.	PR: 31/31	PR: 14/14	PR: 36/36		
TPM	126	125 R/ 1 Ko	34 (27,0%)	24 (19,0%)	68 (54,0%)	5,18	-
		MDR1-Aufteil.	PR: 33/34	PR: 24/24	PR: 68/68		
			Ko: 1/34				
VPA	563	506 R/ 57 Ko	178 (31,6%)	100 (17,8%)	285 (50,6%)	35,2	94
		MDR1-Aufteil.	PR: 162	PR: 93	PR: 251		
			Ko: 16	Ko: 7	Ko: 34		

Tabelle 23: Tabelle für AED, welche Substrat für MDR1 sind (Signifikanzen wurden mittels χ^2 -Test, bei Fallzahlen unter 5 mittels Fisher's -Exact-Test berechnet) Legende: PR = Studiengruppe; Ko = Kontrollgruppe

		NW				
AED	NW	ZNS	Müdigkeit	Verschlechterung Anfälle/EEG	GI	Allergisch
CBZ	62 (39%)	43 (69,4%)	15 (34,9%)	7 (16,3%)	9 (14,5%)	4 (6,5%)
		TT: 13/43	TT: 7/15*	TT: 2/7	TT: 0/9**	TT: 0/4
		CC: 7/43	CC: 1/15*	CC: 1/7	CC: 4/9**	CC: 1/4
		CT: 23/43	CT: 7/15	CT: 4/7	CT: 5/9	CT: 3/4
FBM						
GBP						
LTG	54 (31,6%)	30 (55,6%)	4 (13,3%)	9 (30%)	12 (22,2%)	8 (14,8%)
		TT: 8/30	TT: 2/4	TT: 5/9	TT: 1/12	TT: 2/8
		CC: 7/30	CC: 2/4	CC: 0/9	CC: 3/12	CC: 3/8
		CT: 15/30	CT: 0/4	CT: 4/9	CT: 8/12	CT: 3/8
OXC	96 (39,5%)	63 (65,6%)	20 (31,7%)	14 (22,2%)	13 (13,5%)	10 (10,4%)
		TT: 28/63	TT: 8/20	TT: 7/14	TT: 3/13	TT: 4/10
		CC: 16/63	CC: 5/20	CC: 3/14	CC: 3/13	CC: 4/10
		CT: 19/63	CT: 7/20	CT: 4/14	CT: 7/13	CT: 2/10
PB	40 (28,6%)	30 (75%)	4 (13,3%)	4 (13,3%)	5 (12,5%)	1 (2,5%)
		TT: 10/30		TT: 2/4	TT: 1/5	
		CC: 7/30		CC: 1/4	CC: 2/5	
		CT: 13/30	CT: 4/4	CT: 1/4	CT: 2/5	CT: 1/1
PHT	38 (47%)	15 (21,2%)	2 (13,3%)	5 (33,3%)	2 (5,3%)	4 (10,6%)
		TT: 6/15	TT: 1/2	TT: 2/5	TT: 1/2	TT: 1/4
		CC: 1/15	CC: 0/2	CC: 1/5	CC: 0/2	CC: 0/4
		CT: 8/15	CT: 1/2	CT: 2/5	CT: 1/2	CT: 3/4
TPM	55 (43,6%)	42 (51,0%)	5 (11,9%)	9 (21,4%)	8 (14,4%)	1 (1,8%)
		TT: 16/42	TT: 3/5	TT: 4/9	TT: 1/8	
		CC: 10/42	CC: 1/5	CC: 2/9	CC: 4/8	
		CT: 16/42	CT: 1/5	CT: 3/9	CT: 3/8	CT: 1/1
VPA	249 (44,2%)	70 (28,1%)	40 (16,1%)	24 (9,6%)	65 (26,1%)	9 (3,6%)
		TT: 21/70	TT: 14/40	TT: 11/24	TT: 16/65	TT: 2/9
		CC: 18/70	CC: 6/40	CC: 2/24	CC: 13/65	CC: 5/9
		CT: 31/70	CT: 20/40	CT: 11/24	CT: 34/65	CT: 2/9

Fortsetzung Tabelle 23

AED	Wirksamkeit	häufigster Absetzungsgrund	Signifikanz
CBZ	13,8% anfallsfrei	Anfallspersistenz/Wirkungslosigkeit	
			* P=0,035; Odds Ratio=12,25
			**P= 0,082; Odds Ratio= 0,064
FBM	WL	WL	
GBP	WL	WL	
LTG	7,6% anfallsfrei	Anfallspersistenz/Wirkungslosigkeit	keine Signifikanzen
OXC	8,6% anfallsfrei	Anfallspersistenz/Wirkungslosigkeit	keine Signifikanzen
PB	11,4% anfallsfrei	Anfallspersistenz/Wirkungslosigkeit	keine Signifikanzen
PHT	7,4% anfallsfrei	Wirkungslosigkeit/Anfallspersistenz/NW	keine Signifikanzen
TPM	7,9% anfallsfrei	Wirkungslosigkeit/Anfallspersistenz/NW	keine Signifikanzen
VPA		Wirkverlust, Wirkungslosigkeit	keine Signifikanzen

Fortsetzung Tabelle 23

3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: **Celina v. Stülpnagel Freifrau v. Oefe**
Geburtsdatum/-ort: 21. September 1975 in Darmstadt
Zur Person: Staatsangehörigkeit deutsch; verheiratet, eine Tochter

Beruflicher Werdegang

16.10.2006 – dato: Assistenzärztin
Städtisches Krankenhaus München – Harlaching
Klinik für Kinder – und Jugendmedizin,
Chefarzt Prof. R. Roos

01.11.2005 – 15.10.2006: Assistenzärztin
Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen
Kinderspital der LMU; Abteilung für Pädiatrische Neurologie
und Entwicklungsneurologie, Leiter Prof. F. Heinen,
Chefarzt Prof. D. Reinhardt

01.02.2002 – 30.06.2003 und
01.12.2003 – 30.09.2005: Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin
Behandlungszentrum Vogtareuth, Abteilung Neuropädiatrie,
Chefarzt Dr. H. Holthausen

01.01.2002 – 31.01.2002: Ärztin im Praktikum
Fachklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Gauting,
Chefarzt Dr. med. W. Frank

Studium

10/2001: Ärztliche Prüfung
10/2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000 – 10/2001: Praktisches Jahr an der LMU München, Azienda
Ospedaliera Careggi Florenz/Italien und Royal College of
Surgeons Dublin(Irland)

09/2000: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/1998: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1997: Ärztliche Vorprüfung
11/1995 – 10/2001: Studium der Humanmedizin, LMU München

Schulausbildung

30.06.1995: Allgemeine Hochschulreife
09/1988 – 06/1995: Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing (neusprachlich)
09/1986 – 06/1988: Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg (naturwissenschaftlich)
09/1982 – 06/1986: Volksschule Planegg

4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Rudolf Gruber, für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung sowie die freundliche Bereitschaft zum Gedankenaustausch und damit verknüpfte Anregung.

Dr. Herbert Plischke möchte ich für seine stets verständnisvolle Betreuung, seine wohlwollende Kritik und die damit verbundene Anregung, sowie die gesamte Unterstützung im Aufbau der vorliegenden Studie herzlich danken.

Dr. Gerhard Kluger danke ich für die neuropädiatrische Ausbildung, die ich im Behandlungszentrum Vogtareuth beginnen durfte, sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Patientenrekrutierung, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Einen besonderen Dank an Dr. Holthausen, der die Durchführung dieser Studie an Patienten des Behandlungszentrums Vogtareuth ermöglichte, sowie für seine Unterrichtung in kindlicher Epileptologie.

Für die Hilfe bei der Haplotypenanalyse mittels Snapshot Technik danke ich Privatdozent Dr. Peter Zill und seinem Labor.

Den Mitarbeiterinnen des Labors von Privatdozent Dr. Rudolf Gruber insbesondere Dr. Wolfgang Kuon danke ich für die technische Unterstützung sowie die konstruktiven Anregungen.

Für die Hilfe bei der Patientenrekrutierung danke ich meinen Kollegen im Behandlungszentrum Vogtareuth, sowie den Kollegen Dr. Johannes Neuberger (Kinderklinik Memmingen), Dr. Steffen Leiz (Kinderklinik 3. Orden München) und Dr. Reinhard Koch (Kinderklinik Schweinfurt).

Meiner Familie bin ich für ihre allgegenwärtige Unterstützung – der Betreuung meiner kleinen Tochter – um mich für diese Arbeit freizustellen - sehr dankbar und meinem Vater für seine 24h-Hilfe bei allen PC- und Accessproblemen.